

RENORBIO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Associação do papaya meleira virus e de um segundo
vírus de ssRNA à meleira do mamoeiro**

TATHIANA FERREIRA SÁ ANTUNES

VITÓRIA – ES

2017



RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Associação do papaya meleira virus e de um segundo
vírus de ssRNA à meleira do mamoeiro**

Tathiana Ferreira Sá Antunes

Vitória – ES

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

TATHIANA FERREIRA SÁ ANTUNES

**Associação do papaya meleira virus e de um segundo
vírus de ssRNA à meleira do mamoeiro**

Vitória – ES

2017

Tathiana Ferreira Sá Antunes

Associação do papaya meleira virus e de um segundo vírus de ssRNA à meleira do mamoeiro

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob orientação da Prof. Dra. Patricia Machado Bueno Fernandes como parte dos requisitos a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Vitória – ES

2017

TATHIANA FERREIRA SÁ ANTUNES

Associação do papaya meleira virus e de um segundo vírus de ssRNA à meleira do mamoeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Patricia Machado Bueno Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador

Prof. Dr^a. Diolina Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador

Prof. Dr José Aires Ventura
Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e
Extensão Rural / Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador

Prof. Dr^a. Maite Vaslin de Freitas Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Examinador

VITÓRIA

2017

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Principais produtores mundiais de mamão em 2014. A Índia é o maior produtor seguido pelo Brasil. Fonte: FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. 15
- Figura 2. Mamoeiro (*Carica papaya*) com sintomas típicos da meleira. a, b) Exsudação espontânea de látex fluido e aquoso observada na superfície dos frutos; c) Pequenas lesões necróticas nas pontas de folhas jovens..... 16
- Figura 3. Representação esquemática da organização genômica dos *Totivírus*. O dsRNA viral tipicamente possui duas ORFs sobrepostas. A ORF1 codifica para a proteína capsidial (CP) e a RdRp (Figura 2). A RdRp é expressa como uma proteína fusionada a CP (CP/RdRp) através de uma mudança de fase de leitura ribossomal. O heptanucleotídeo e a estrutura secundária de pseudo-nó necessários para a mudança de fase ribossomal estão localizados na extremidade 3' da ORF1. A poliproteína produzida é clivada para a liberação da RdRp. 19
- Figura 4. Representação esquemática da estrutura genômica dos *Umbravírus*. A parte inferior do diagrama mostra os produtos da tradução. O produto predito da ORF1 não foi detectado em plantas infectadas. A poliproteína produzida a partir de ORF 1 e 2 possui os motivos característicos da RdRp viral. O produto ORF 3 atua na proteção do RNA viral e no seu transporte através do floema. A ORF4 codifica para a proteína de movimento e atua no movimento célula-a-célula do vírus. 20
- Figura 5. Estratégias para a identificação e caracterização dos vírus associados à meleira do mamoeiro..... 25
- Figura 6. Padrão de bandas obtido a partir do RNA total extraído do látex de mamoeiros infectados pelo PMeV. S1, Banda correspondente ao RNA do PMeV. S2, Banda de RNA de aproximadamente 4,5 kbp. S1 e S2 são diferentes amostras de látex. M, marcador molecular [1 kb DNA ladder (Biolabs), in kpb]. 35
- Figura 7. Organização genômica e características moleculares do papaya meleira vírus (PMeV). (a) Representação esquemática da organização genômica do PMeV. O dsRNA viral possui duas ORFs em diferentes fases de leitura. A ORF1 codifica uma putativa proteína capsidial (CP) e a ORF2 codifica uma putativa RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A posição do heptanucleotídeo necessário para a mudança de fase ribossomal está indicada na extremidade 3' da ORF1. (b) A estrutura secundária de pseudo-nó predita localizada à jusante do heptanucleotídeo. 37
- Figura 8. Alinhamento do domínio RdRp4 do PMeV e vírus relacionados. Alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio RdRp4 (pfam02123) identificado na ORF2 do papaya meleira vírus (PMeV) com as regiões correspondentes dos seis vírus semelhantes totivírus mais estreitamente relacionados com o PMeV (na Tabela 2 a lista com o nome completo dos vírus e o n° de acesso no GenBank). As sequências foram alinhadas no MUSCLE (Edgar, 2004). Os números entre parênteses indicam o número de resíduos de aminoácidos separando os motivos individuais. Os resíduos de aminoácidos marcados em preto são conservados entre todas as sequências alinhadas. 39
- Figura 9. Representação esquemática da organização genômica do papaya umbravírus (PMeV2). O ssRNA viral possui duas ORFs em diferentes fases de leitura. A ORF1 codifica para uma proteína hipotética e a ORF2 codifica para uma putativa RdRp. 39

Figura 10. Relação filogenética entre o PMeV e vírus relacionados. Árvore filogenética baseada no alinhamento das seqüências de aminoácidos do domínio RdRp4 da replicase do papaya meleira virus (PMeV), de vírus relacionados aos totivirus e de membros da família *Totiviridae*. A árvore foi obtida pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade a posteriori estão indicados em cada nó da árvore. Os nomes do vírus utilizados na análise e seus respectivos n° de acesso no Genbank estão listados na Tabela 2.

..... 41

Figura 11. Relação filogenética entre o PMeV2 e vírus relacionados. Árvore filogenética baseada no alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína RdRp do papaya umbravirus (PMeV2) e de membros da família *Tombusviridae*. A árvore foi obtida pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade a posteriori estão indicados em cada nó da árvore. Os nomes do vírus utilizados na análise e seus respectivos n° de acesso no Genbank estão listados na Tabela 2.

..... 42

Figura 12. Análise das partículas virais purificadas a partir do látex de frutos de mamoeiros com sintomas da meleira. (a) Frações virais obtidas após a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. T, topo; M, meio. B, baixo. (b) Imagens das partículas virais presentes em cada fração, T, M e B, por Microscopia Eletrônica de Transmissão. As imagens das frações T e M, com 140,000x e a imagem da fração B, com 85,000x. (c) Eletroforese em gel de agarose do RNA extraído a partir das partículas presentes nas frações M e B. Não foi visualizado RNA a partir das partículas presentes na fração T. No primeiro poço da esquerda visualiza-se o marcador molecular [1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), em kpb].

..... 44

Figura 13. Mapa peptídico da proteína estrutural (CP) do PMeV e PMeV2 identificado na seqüência de aminoácidos predita para a proteína codificada pela ORF1 do PMeV. (a) Lista dos nove peptídeos identificados por espectrometria de massa, incluindo os valores de escore fornecidos pelo MASCOT e a posição de início e término dentro da seqüência de aminoácidos predita para a ORF1. (b) Destacam-se em vermelho os nove peptídeos identificados e listados na letra (a) na seqüência de aminoácidos para a porção central da ORF1. Todos os nove peptídeos apresentam 100% de identidade com a seqüência de aminoácidos predita para a ORF1 do PMeV. A sequência completa da ORF1 do PMeV é 1563 aminoácidos.

..... 45

Figura 14. Limite de detecção do PMeV e do PMeV2 por RT-PCR. O cDNA correspondente a cada genoma viral foi diluído nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . 1- Banda correspondente a amplificação do PMeV2. 2- Banda correspondente a amplificação do PMeV. M - Marcador molecular [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].

..... 46

Figura 15. Limite de detecção do PMeV e do PMeV2 por multiplex RT-PCR. Os cDNAs correspondentes a cada genoma viral foram diluídos nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . 1- Banda correspondente a amplificação do PMeV2. 2- Banda correspondente a amplificação do PMeV. M - Marcador molecular [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].

..... 46

Figura 16. Quantificação relativa do acúmulo do PMeV e PMeV2 em mamoeiros assintomáticos e sintomáticos para a meleira. Quantificação relativa do PMeV e PMeV2 por qRT-PCR. O gene que codifica para eIF4 foi usado para normalização e o acúmulo do PMeV e PMeV2 nas plantas sintomáticas foi calculado em relação a expressão nas plantas assintomáticas.

..... 47

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos usados na detecção e na amplificação do genoma do PMeV e PMeV2.	28
Tabela 2. Nome, sigla, número de acesso e classificação taxonômica dos vírus relacionados aos totívirus utilizados na análise filogenética.	29
Tabela 3 Nome, sigla, número de acesso e classificação taxonômica dos vírus relacionados aos umbravírus utilizados na análise filogenética.	30

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BcRV-1	<i>Botrytis cinerea RNA virus-1</i>
CMOV	<i>Carrot mottle virus</i>
CMV	<i>Carrot mottle mimic virus</i>
CP	Proteína capsidial (do inglês <i>Capsid protein</i>)
CYVaV	<i>Citrus yellow vein-associated virus</i>
dsRNA	RNA fita dupla (do inglês <i>Double-stranded RNA</i>)
EST	Sequências gênicas expressas (do inglês <i>Expressed Sequence Tag</i>)
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês <i>Food and agriculture organization of the united nations</i>)
FgV-3	<i>Fusarium graminearum dsRNA mycovirus-3</i>
FvRV-1	<i>Fusarium virguliforme dsRNA mycovirus-1</i>
IMNV	infectious myonecrosis virus
Kpb	Kilo pares de base
MATV	maize-associated totivirus
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MP	Proteína de movimento (do inglês <i>Movement protein</i>)
NGS	Sequenciamento de nova geração (do inglês <i>Next Generation Sequencing</i>)
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
ORF	Open reading frame
pb	Pares de base

PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
PiRV-3	<i>Phytophthora infestans RNA virus 3</i>
PgV-2	<i>Phlebiopsis gigantea mycovirus dsRNA-2</i>
PMCV	piscine myocarditis virus
PMeV	papaya meleira virus
PMeV-ES	papaya meleira virus isolado coletado no Espírito Santo
PMeV-Mx	papaya meleira virus isolado mexicano do PMeV
PMeV-RN	papaya meleira virus isolado coletado no Rio Grande do Norte
PnVA	panax notoginseng virus A
PMeV2	papaya umbravirus
PpVQ	papaya virus Q
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA (do Inglês <i>RNA dependent RNA polimerase</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa-Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
siRNA(s)	Pequeno(s) RNA(s) de interferência (do inglês <i>Small interfering RNA</i>)
sRNA(s)	Pequeno(s) RNA(s) (do inglês <i>Small RNA</i>)
SsNsV-L	<i>Sclerotinia sclerotiorum nonsegmented virus-L</i>
ssRNA	RNA fita simples (do inglês <i>Single-stranded RNA</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A importância econômica do mamão	15
1.2. A Meleira do Mamoeiro.....	15
1.3. Etiologia da Meleira	17
1.4. A família <i>Totiviridae</i>	18
1.5. O gênero <i>Umbravirus</i>	20
1.6. Sequenciamento de alto desempenho aplicada a virologia de planta	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. Geral.....	24
2.2. Específicos	24
3. ESTRATÉGIAS	25
4. METODOLOGIA.....	26
4.1. Coleta de látex de plantas de <i>Carica papaya</i> no campo	26
4.2. Sequenciamento do genoma viral e análise de bioinformática.....	26
4.3. Análise das sequências e filogenética	28
4.4. Purificação viral e caracterização das proteínas estruturais.....	31
4.5. Determinação do limiar de detecção dos vírus associados à meleira do mamoeiro por Multiplex RT-PCR e detecção em plantas assintomáticas.....	31
4.6. Diagnóstico dos vírus associados à meleira do mamoeiro por RT-PCR	32
4.7. Avaliação do acúmulo viral relativo do PMeV e PMeV2 por qRT-PCR.....	33
5. RESULTADOS	35
5.1. Identificação e sequenciamento de genomas virais associados à meleira.....	35
5.2. Organização genômica e características dos vírus associados à meleira.....	36
5.3. Análises Filogenéticas	40
5.4. Purificação da partícula viral e caracterização do RNA viral e das proteínas estruturais	43
5.5. Diagnóstico por multiplex RT-PCR do PMeV e PMeV2.....	46
5.6. A meleira do mamoeiro está associada a presença de dois vírus, PMeV e PMeV2	47
5.7. Acúmulo Viral Relativo do PMeV e PMeV2.....	47
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	52

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9. ANEXOS	58

RESUMO

A meleira do mamoeiro é uma das principais doenças que afeta a cultura no Brasil e no México, podendo ocasionar a perda completa da lavoura. O agente etiológico da meleira foi identificado como um vírus de partícula isométrica e genoma composto por uma única molécula de RNA fita dupla (dsRNA), o papaya meleira virus (PMeV). Neste trabalho, uma sequência parcial, de 8.814 nucleotídeos, foi obtida para o dsRNA do PMeV. O RNA viral possui duas possíveis ORFs e estas apresentaram maior similaridade, respectivamente, com a proteína capsidial e com a RdRp de micovírus relacionados à família *Totiviridae*. Além do dsRNA do PMeV, uma segunda banda de RNA, de aproximadamente 4,5 kb, foi isolada a partir do látex de mamoeiros com sintomas severos de meleira. A sequência obtida para este RNA é de 4.515 nucleotídeos e possui duas possíveis ORFs. Estas ORFs apresentaram, respectivamente, 48% e 73% de identidade de sequência com as proteínas correspondentes do papaya virus Q, um umbravírus recentemente detectado em plantas de mamão no Equador. A purificação viral realizada em gradiente de sacarose permitiu a separação de partículas contendo cada um dos diferentes RNAs. A análise por espectrometria de massa indicou que tanto o PMeV como o segundo RNA (nomeado papaya meleira virus 2, PMeV2) foram encapsidados em partículas formadas pela proteína codificada pela ORF1 do PMeV. A presença de ambos, PMeV e PMeV2, foi confirmada em todas as plantas apresentando sintomas típicos de meleira, coletadas no campo. Curiosamente, apenas o PMeV foi detectado em plantas assintomáticas. Estes resultados indicam que a meleira do mamoeiro está associada à infecção mista pelo PMeV e PMeV2.

Palavras chave: Meleira do mamoeiro, Totiviridae, Umbravirus, PMeV, PMeV2.

ABSTRACT

Papaya sticky disease, or “meleira”, is one of the major diseases of papaya in Brazil and Mexico, capable of causing complete crop loss. The causal agent of sticky disease was identified as an isometric virus with a double stranded RNA (dsRNA) genome, named papaya meleira virus (PMeV). In the present study, the nearly complete sequence was obtained for PMeV dsRNA which 8,814 nucleotides long and contains two putative ORFs; the predicted ORF1 and ORF2 display similarity to capsid proteins and RdRp's, respectively, from mycoviruses tentatively classified in the family *Totiviridae*. Besides PMeV dsRNA, a second RNA band of approximately 4.5 kb was isolated from latex of papaya plants with severe symptoms of sticky disease. The sequence obtained for the second RNA is 4,515 nucleotides long and contains two putative ORFs. The predicted ORFs 1 and 2 display 48% and 73% sequence identity, respectively, with the corresponding proteins of papaya virus Q, an umbravirus recently described infecting papaya in Ecuador. Viral purification in a sucrose gradient allowed separation of particles containing each RNA. Mass spectrometry analysis indicated that both PMeV and the second RNA (named papaya meleira virus 2, PMeV2) were encapsidated in particles formed by the protein encoded by PMeV ORF1. The presence of both PMeV and PMeV2 was confirmed in field plants showing typical symptoms of sticky disease. Interestingly, PMeV was detected alone in asymptomatic plants. Together, our results indicate that sticky disease is associated with double infection by PMeV and PMeV2.

Key words: Sticky disease, Totiviridae, Umbravirus, PMeV, PMeV2

1. INTRODUÇÃO

1.1. A importância econômica do mamão

O mamão é uma das frutas com maior produção no mundo, sendo aproximadamente 12,7 milhões de toneladas produzidas no ano de 2014. Os principais produtores mundiais de mamão são a Índia, Brasil, Nigéria, Indonésia e México (Figura 1) (Faostat, 2014).

O Brasil, segundo maior produtor, é o responsável por 12,6% da produção mundial (Figura 1). Em 2014, as plantações de mamão ocuparam uma área de 32 mil hectares com um rendimento médio de 50 t / ha, e o valor da produção estimado em \$ 786 milhões de dólares (Faostat, 2014). As maiores plantações estão localizadas no estado do Espírito Santo e Bahia, ocupando mais de 18 mil hectares.

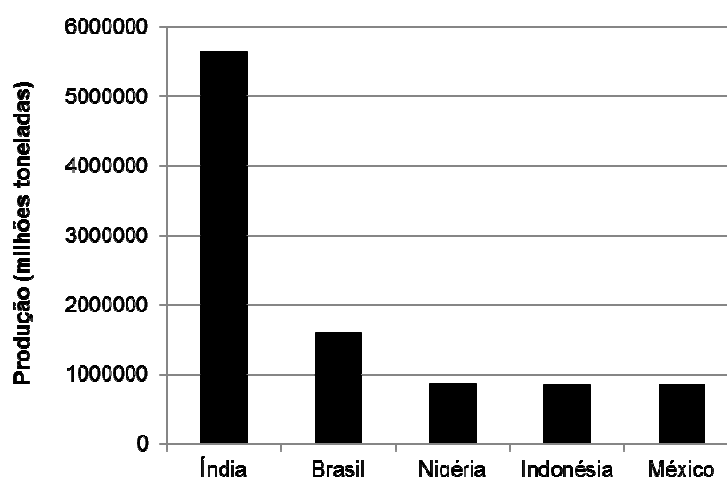


Figura 1. Principais produtores mundiais de mamão em 2014. A Índia é o maior produtor seguido pelo Brasil. Fonte: FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.

A demanda por frutos de alta qualidade é grande, sendo os principais importadores do mamão brasileiro os países europeus e os Estados Unidos. No entanto, a cultura é bastante suscetível a diversos patógenos. Um dos principais fatores limitantes da produção é a susceptibilidade das plantas às viroses, o que resulta no menor rendimento e na má qualidade da fruta (Ventura, J. A. *et al.*, 2004).

1.2. A Meleira do Mamoeiro

A meleira do mamoeiro foi relatada na década de 80 nos estados brasileiros da Bahia e do Espírito Santo. Em poucos anos a doença atingiu os estados de

Pernambuco e do Ceará. Atualmente esta doença ocorre no Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (Daltro *et al.*, 2014). Fora do Brasil, o México é o único país onde a meleira do mamoeiro já foi relatada (Perez-Brito *et al.*, 2012).

Na ocorrência da meleira verifica-se a exsudação espontânea de látex aquoso e fluido de frutos e folhas, consequência da ruptura dos laticíferos pelo aumento da turgência e alterações morfológicas do látex derivadas da presença do patógeno (Ventura, José Aires *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2009). Em contato com o ar, o látex é oxidado e causa pequenas lesões necróticas nas pontas de folhas jovens e à coloração escura e “melada” no fruto (Figura 2). Em estágio avançado da doença, são observadas áreas irregulares verde-clara na superfície de frutos infectados (Ventura, José Aires *et al.*, 2004). No México, embora os sintomas da doença sejam semelhantes aos descritos no Brasil, mamoeiros cv. Maradol apresentam uma exsudação de látex mais severa, mas não apresentam necrose das pontas das folhas (Perez-Brito *et al.*, 2012).



Figura 2. Mamoeiro (*Carica papaya*) com sintomas típicos da meleira. a, b) Exsudação espontânea de látex fluido e aquoso observada na superfície dos frutos; c) Pequenas lesões necróticas nas pontas de folhas jovens.

Estudos com diferentes genótipos de mamoeiro ainda não identificaram a existência de um cultivar resistente à doença. Assim, a identificação dos sintomas e a subsequente erradicação das plantas doentes (roguing) é atualmente a única

estratégia de controle da doença no campo. Entretanto, os sintomas somente são visíveis após a floração e, portanto, plantas infectadas podem permanecer no campo constituindo uma importante fonte de vírus (Abreu *et al.*, 2015). Atualmente, dois métodos de diagnóstico, através de RT-PCR e RT-PCR quantitativo, têm permitido a identificação precoce de plantas assintomáticas, porém infectadas (Abreu *et al.*, 2012).

1.3. Etiologia da Meleira

Inicialmente, os sintomas da meleira foram atribuídos a um distúrbio na absorção de cálcio e boro, associado a estresse hídrico resultante da falta de água no solo (Nakagawa *et al.*, 1987). Além dos fatores abióticos, foi sugerido o envolvimento de microorganismos na indução dos sintomas da meleira, após o isolamento de bactérias do gênero *Bartonella* a partir de plantas doentes (Akiba, 1989).

Estudos de dispersão da meleira no campo indicaram associação de um patógeno com a doença (Rodrigues *et al.*, 1989). Em estudos preliminares, verificou-se o aparecimento de sintomas após 60 dias em que plantas sadias foram inoculadas com látex obtido a partir de plantas infectadas. Isso sugeriu que o agente causador da doença estivesse presente no látex das plantas (Rodrigues *et al.*, 1989). A análise do látex de plantas doentes indicou a presença de partículas isométricas de aproximadamente 42 nm de diâmetro, através de microscopia eletrônica, e uma banda de aproximadamente 10.000 pares de bases (pb) pôde ser visualizada em gel de agarose (Kitajima *et al.*, 1993).

A etiologia viral da doença foi confirmada após a purificação das partículas virais presentes no látex, seguida de inoculação em mamoeiros sadios, que se tornaram doentes. O material genético viral extraído a partir de partículas purificadas foi confirmado ser composto de RNA fita dupla (dsRNA) devido à sua susceptibilidade a RNase A e à resistência à digestão com DNase e S1 Nuclease, que degrada apenas ssRNA. Assim, o papaya meleira virus foi classificado como um vírus de genoma de dsRNA com cerca de 10 (Kitajima *et al.*, 1993) ou 12 kb (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003).

Cortes ultrafinos dos tecidos revelaram que essas partículas isométricas estavam restritas às células dos vasos laticíferos (Kitajima *et al.*, 1993). Posteriormente, dados de microscopia eletrônica e dados moleculares indicaram que as partículas

virais estavam fortemente ligadas aos polímeros presentes no látex, possivelmente como um mecanismo de proteção ou para auxiliar o transporte viral (Rodrigues *et al.*, 2005).

Uma análise comparativa de um fragmento de aproximadamente 560 pb da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) de isolados do PMeV coletados em plantas de mamão nos principais estados produtores do Brasil, revelou uma semelhança do PMeV com micovírus da família *Totiviridae* (Araújo *et al.*, 2007; Daltro *et al.*, 2014). A sequência completa do genoma de um isolado do PMeV coletado no Rio Grande do Norte (PMeV-RN), obtida utilizando a plataforma 454 GS FLX, foi de 8,7 kb. Análises *in silico* da sequência revelaram que a ORF 2 do PMeV possui os domínios conservados característicos das RdRps de micovírus da família *Totiviridae* (Abreu E. *et al.*, 2015).

No México, a presença do dsRNA viral também foi confirmada em plantas com sintomas característicos da meleira, e plantas sadias inoculadas com o látex de plantas infectadas desenvolveram os sintomas da doença (Perez-Brito *et al.*, 2012). Em uma biblioteca de cDNA gerada a partir do RNA total extraído do látex de plantas infectadas pelo isolado viral mexicano (denominado PMeV-Mx), foi identificada uma sequência de 1154 pb codificando para uma potencial RdRp com alta similaridade a replicase de umbravirus. Curiosamente, apesar da sequência obtida para o PMeV-Mx não apresentar similaridade com o PMeV-RN, os oligonucleotídeos desenhados com base na sequência obtida para o PMeV-Mx amplificaram fragmentos a partir de plantas infectadas tanto do México como do Brasil, e esses fragmentos apresentaram 100% de identidade de nucleotídeos (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015).

A caracterização molecular do genoma viral é o primeiro requisito para o desenvolvimento de medidas satisfatórias de controle. Portanto, a classificação taxonômica do(s) vírus causador(es) da meleira deve ser definida.

1.4. A família *Totiviridae*

Os vírus pertencentes à família *Totiviridae* possuem genoma composto por uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA) encapsidado em um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 40nm. O dsRNA viral possui duas ORFs que podem estar sobrepostas ou separadas e codificam para a proteína capsidial (CP) e para a RdRp (Figura 3). Diferentes estratégias de expressão da RdRp são utilizadas pelos vírus dessa família (King *et al.*, 2011). A RdRp é comumente expressa como uma proteína

fusionada à CP (CP/RdRp) através de uma mudança de fase de leitura ribossomal (Dinman *et al.*, 1991), sendo a poliproteína em seguida clivada para a liberação da RdRp (Kang *et al.*, 2001). Em alguns casos, a RdRp é expressa separada da CP através de um mecanismo de terminação-reiniciação da tradução (Huang e Ghabrial, 1996; Li *et al.*, 2011).

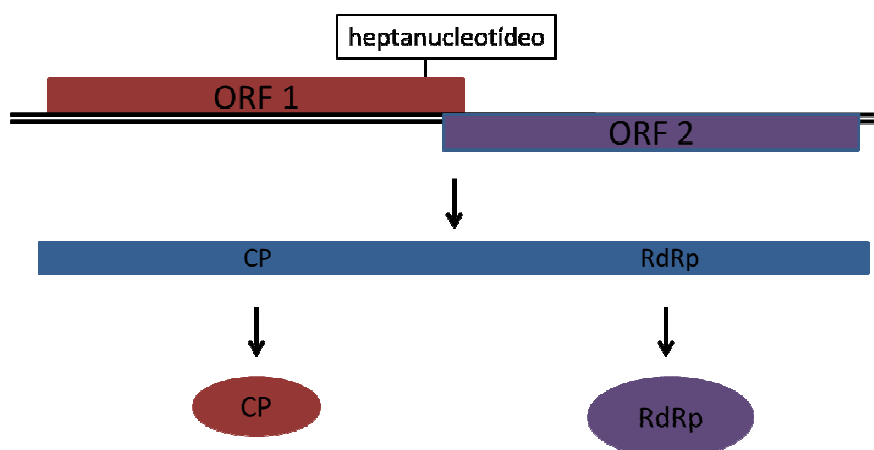


Figura 3. Representação esquemática da organização genômica dos *Totivirus*. O dsRNA viral tipicamente possui duas ORFs sobrepostas. A ORF1 codifica para a proteína capsidial (CP) e a RdRp (Figura 2). A RdRp é expressa como uma proteína fusionada a CP (CP/RdRp) através de uma mudança de fase de leitura ribossomal. O heptanucleotídeo e a estrutura secundária de pseudo-nó necessários para a mudança de fase ribossomal estão localizados na extremidade 3' da ORF1. A poliproteína produzida é clivada para a liberação da RdRp.

Atualmente, 28 espécies de totivirus são reconhecidas pelo ICTV (em inglês, *International Committee on Taxonomy of Viruses*). A família é dividida em cinco gêneros: *Totivirus*, *Victorivirus*, *Giardiavirus*, *Trichomonasvirus* e *Leishmanivirus*. Os membros da família *Totiviridae* infectam fungos (*Victorivirus* and *Totivirus*) ou protozoários (*Giardiavirus*, *Leishmanivirus*, *Trichomonasvirus*) (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Entretanto, novos totívirus ou vírus semelhantes aos totívirus tem como hospedeiros outros organismos eucarióticos. Entre eles, os vírus infectious myonecrosis virus (IMNV) (Poulos *et al.*, 2006), piscine myocarditis virus (PMCV) (Haugland *et al.*, 2011) e maize-associated totivirus (MATV) (Chen *et al.*, 2015) são capazes ou suspeitos de causar sintomas em seus hospedeiros.

Liu *et al.* (2012), através de uma análise *in silico* utilizando as sequências de vírus de dsRNA como dado de entrada (queries) contra o banco de dados de sequências gênicas expressas (EST) do NCBI, identificou em plantas sequências semelhantes a

vírus da família *Totiviridae*. Em outra abordagem, o sequenciamento de pequenos RNAs (sRNA, do inglês *small RNA*) de plantas de milho resultou na identificação de um novo vírus de dsRNA, com uma sequência e organização genômica semelhante a de um totivírus (Chen *et al.*, 2015).

1.5. O gênero *Umbravirus*

Os vírus pertencentes ao gênero *Umbravirus* infectam plantas e possuem genoma composto por uma molécula de RNA fita simples (ssRNA, do inglês *single-stranded RNA*) sentido positivo. O RNA viral possui uma curta extremidade 5', quatro ORFs e não possui cauda poliA na extremidade 3'. A ORF1 codifica uma possível proteína de 31 kDa que nunca foi detectada em plantas infectadas. A ORF2 se sobrepõe ligeiramente à extremidade 3' da ORF1 e é traduzida como uma proteína fusionada de 95 kDa. Imediatamente antes do códon de parada da ORF1 existe uma sequência de sete nucleotídeos essencial à mudança de fase de leitura ribossomal. A poliproteína contém, na região da ORF2, os motivos característicos de uma RdRp viral. As ORF3 e ORF4, que se sobrepõem quase completamente, são expressas em diferentes fases de leitura (Ryabov *et al.*, 2012). A ORF3 codifica para uma proteína de 27 kDa envolvida na proteção do RNA viral e no movimento a longa distância do vírus (Taliensky *et al.*, 2003). A ORF4 codifica para uma proteína de movimento (MP, do inglês *movement protein*) de 28 kDa, necessária para o movimento célula-a-célula do vírus (Taliensky e Robinson, 2003) (Figura 4).

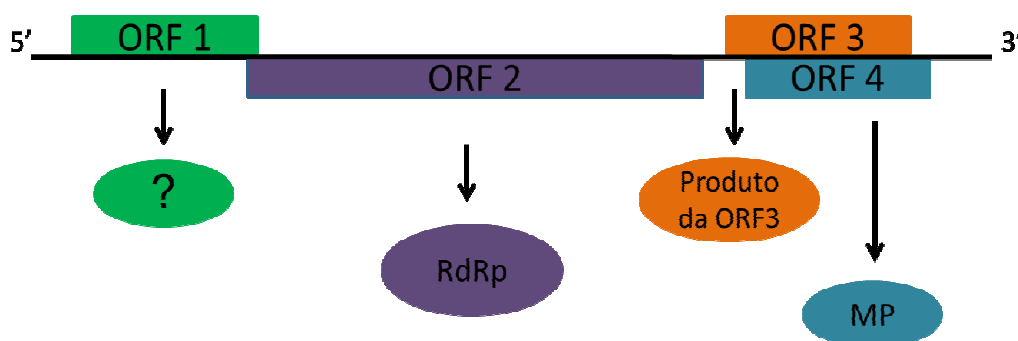


Figura 4. Representação esquemática da estrutura genômica dos *Umbravirus*. A parte inferior do diagrama mostra os produtos da tradução. O produto predito da ORF1 não foi detectado em plantas infectadas. A poliproteína produzida a partir de ORF 1 e 2 possui os motivos característicos da RdRp viral. O produto ORF 3 atua na proteção do RNA viral e no seu transporte através do floema. A ORF4 codifica para a proteína de movimento e atua no movimento célula-a-célula do vírus.

Os umbravírus distinguem-se da maioria dos outros vírus pela ausência de um gene codificando para a proteína do capsídeo (CP) e, como resultado, não são capazes de formar partículas virais convencionais. Na natureza, eles dependem da presença de um vírus auxiliar para a encapsidação do RNA genômico e para a transmissão para outras plantas. Na infecção mista, o RNA do umbravírus é encapsidado pela proteína do capsídeo do vírus auxiliar e o vírion formado é transmitido por afídeos. As associações virais entre os umbravírus, até hoje descritas, são exclusivamente com os membros da família *Luteoviridae* (Taliensky e Robinson, 2003).

A trans-encapsidação não é necessária para o acúmulo viral nas células vegetais infectadas, uma vez que a função de proteção e de movimento do RNA viral não é dependente do vírus auxiliar nem de sua CP (Demler *et al.*, 1994). Em condições experimentais, a transmissão mecânica dos umbravírus pode ocorrer sem a ajuda de um vírus auxiliar, permitindo-lhes, infectar as plantas sistemicamente sem a CP e sem produzir partículas virais. Os umbravírus e seus vírus auxiliares são independentemente infecciosos, ou seja, são capazes de se replicar e infectar o hospedeiro em infecções simples. Mas, em associação, eles causam doenças específicas e podem causar sintomas mais severos que nas infecções únicas (Syller, 2003).

A comparação das sequências de aminoácidos mostrou que as RdRps codificadas pelo RNA genômico dos umbravírus pertencem à superfamília de RdRps, que inclui aquelas dos gêneros *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Luteovirus*, *Machlomovirus*, *Necrovirus* e *Tombusvirus*. Uma vez que a RdRp é a única proteína universalmente conservada entre os vírus de RNA fita simples sentido positivo, o gênero *Umbravirus* pode ser considerado como um gênero da família *Tombusviridae* ou um gênero relacionado (Ryabov *et al.*, 2012).

1.6. Sequenciamento de alto desempenho aplicada a virologia de planta

Os vírus de RNA possuem genomas pequenos e simples. Tradicionalmente, as sequências completas de vírus são obtidas a partir do desenho de sucessivos oligonucleotídeos, do sequenciamento dos fragmentos amplificados e da posterior montagem do genoma. Entretanto, esta metodologia demanda tempo e pode ser

dificultada pela variação dentro de cada espécie, além da necessidade do conhecimento prévio do vírus (Marston *et al.*, 2013).

O sequenciamento dos genomas virais completos permite compreender a evolução e epidemiologia dos vírus, o que é dificultado quando a análise filogenética é realizada apenas com as sequências parciais (Radford *et al.*, 2012). Nesse sentido, o advento do sequenciamento de nova geração (NGS) e o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para análise dos dados gerados alterou o estudo da virologia de plantas, permitindo, além do rápido sequenciamento completo de genomas virais, a descoberta de novas espécies e gêneros de vírus (Barba *et al.*, 2014). Com o NGS é possível detectar e caracterizar vírus sem o conhecimento prévio de sua existência, uma vez que não se faz necessária a utilização de oligonucleotídeos específicos (Wu *et al.*, 2012).

O NGS também está sendo utilizado para a identificação de vírus a partir do sequenciamento de pequenos RNAs. Em resposta à infecção por vírus, a planta hospedeira gera pequenas moléculas de RNA derivadas de sequências virais, os chamados de RNAs interferentes (siRNA). O NGS de siRNA oferece a oportunidade de identificação de vírus que infectam a planta com baixa carga viral, em infecções assintomáticas, além de vírus desconhecidos (Kreuze *et al.*, 2009).

O uso das tecnologias de NGS em virologia vegetal revelou que algumas doenças de etiologia desconhecida que afetam diversas plantas são causadas por vírus novos ou já conhecidos, porém, ainda pouco caracterizados. Adams *et al.* (2013) utilizou as técnicas convencionais e NGS para a identificação do patógeno causador de uma nova doença que afeta o milho. Enquanto, as técnicas de ELISA e TEM apresentaram resultados negativos, o uso do sequenciamento permitiu a identificação e caracterização dos vírus *Maize chlorotic mottle virus* e *Sugarcane mosaic virus* causando a necrose letal do milho. Em outra abordagem, um novo vírus foi isolado de uma planta de alface apresentando necrose e enrolamento das folhas. O RNA total extraído de plantas indicadoras inoculadas mecanicamente com o vírus foi utilizado para o sequenciamento e um vírus novo relacionados aos torradovírus foi identificado, o lettuce necrotic leaf curl virus (LNL CV) (Verbeek *et al.*, 2014). Estas observações demonstram que o mundo dos vírus é muito maior do que o previamente imaginado (Roossinck, 2012; Wu *et al.*, 2015).

O NGS, por ser altamente sensível, pode recuperar a sequência quase completa do genoma viral em uma menor quantidade de amostra em comparação com as abordagens convencionais (Datta *et al.*, 2015).

A sequência obtida para o dsRNA viral purificado de plantas com meleira no Brasil apresentou semelhança com vírus da família *Totiviridae*. Em contrapartida, o sequenciamento do cDNA obtido a partir de plantas infectadas no México apresentou semelhança com vírus do gênero *Umbravirus*. É improvável que a meleira do mamoeiro apresentando sintomas semelhantes no Brasil e no México seja causada por diferentes vírus. Assim, neste trabalho, foi utilizada a plataforma de sequenciamento de nova geração, 454 GS-FLX Titanium, para investigar a associação de um segundo vírus à meleira.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Identificar e caracterizar os vírus associados à meleira do mamoeiro.

2.2. Específicos

- Sequenciar o genoma completo dos vírus associados à meleira do mamoeiro através do equipamento 454 Genome Sequencer FLX Titanium (Roche);
- Montar os genomas virais utilizando GS De Novo Assembler (v. 2.6) e o SeqMan NGen (DNASTar);
- Validar as sequências virais por Sequenciamento de Sanger;
- Identificar *in silico* possíveis ORFs nos genomas virais e estruturas secundárias no RNA viral;
- Analisar a relação filogenética entre os vírus associados à meleira e vírus a eles relacionados;
- Purificar as partículas virais associadas à meleira do mamoeiro e identificar as proteínas virais estruturais;
- Detectar os possíveis vírus associados à meleira do mamoeiro em amostras coletadas em plantações;
- Relacionar a presença dos sintomas da meleira ao acúmulo do PMeV e do PMeV2.

3. ESTRATÉGIAS

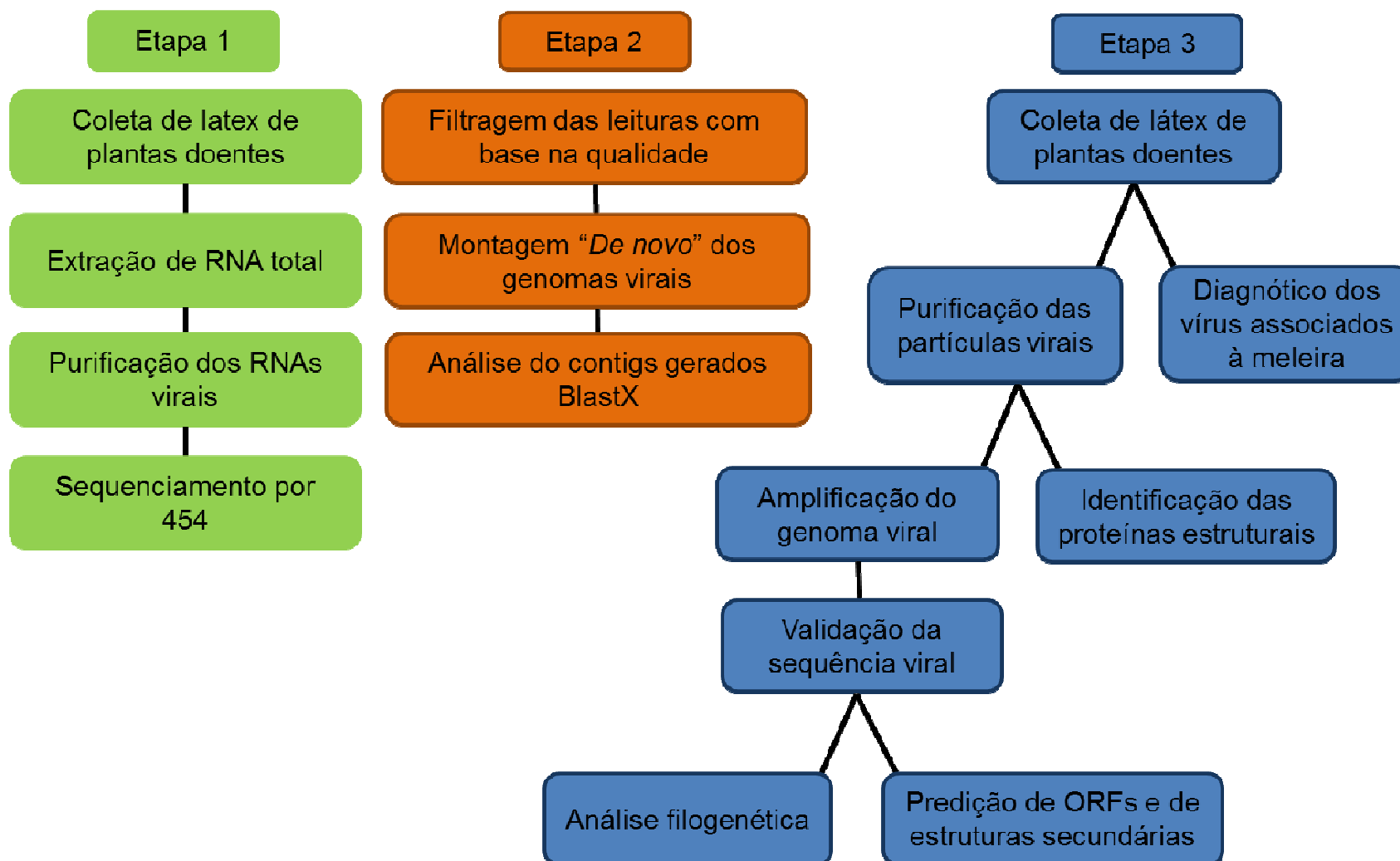


Figura 5. Estratégias para a identificação e caracterização dos vírus associados à meleira do mamoeiro.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta de látex de plantas de *Carica papaya* no campo

Amostras de látex de mamoeiros com sintomas típicos de meleira foram coletadas em Sooretama, Espírito Santo (ES), Brasil. O látex foi amostrado a partir de cada planta usando uma lâmina de bisturi esterilizado e diluído (1:1, v/v) em tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 (Rodrigues *et al.*, 2005).

Amostras adicionais foram coletadas para o diagnóstico dos possíveis vírus associados à meleira. Amostras de látex (5 ml) e folhas (~ 2 g) de mamoeiros cv. Golden foram coletadas em Pinheiros, Baixo Guandu, Iuna, Sooretama e Vitória, ES. As amostras foram divididas em dois grupos: (1) 54 plantas sintomáticas e (2) 45 plantas assintomáticas para a meleira (Anexo 1). As amostras de látex foram misturadas (1: 1, v / v) com citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e armazenadas a -20 ° C e as folhas foram congeladas em gelo seco e armazenadas a -80 ° C.

4.2. Sequenciamento do genoma viral e análise de bioinformática

O RNA total foi extraído a partir do látex das amostras coletadas, conforme descrito por Rodrigues *et al.* (2005). Para a extração do RNA, o mesmo volume de látex, foi adicionado de fenol pH 8,0 e clorofórmio (2:1 v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A precipitação do RNA foi adicionado etanol absoluto gelado e acetato de sódio 3M pH 5,2 a fase aquosa. O RNA total extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas do dsRNA viral do PMeV e uma segunda banda de RNA de aproximadamente 4,5 kb foram excisadas do gel e purificadas usando o Kit PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen, Carlsbad, USA). A qualidade e a pureza do RNA foram avaliadas com base na relação A260/280 utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, Boston, MA, USA).

Uma amostra com os dois RNAs purificados juntos foi enviada para a Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Norte) e sequenciada através da tecnologia 454 GS-FLX Titanium. As leituras foram filtradas com base na qualidade dos nucleotídeos sequenciados. A montagem “*De novo*” do genoma foi realizada utilizando os programas GS De Novo Assembler (v. 2.6) e SeqMan NGen (DNASTar) com os parâmetros padrão. Os contigs montados foram comparados com as sequências disponíveis no GenBank

utilizando o algoritmo BLASTX. Os valores de e-value, medida que considera a probabilidade do alinhamento ter ocorrido por acaso, maiores que 10^{-5} foram desconsiderados.

Para confirmar a autenticidade da sequência obtida, oligonucleotídeos específicos (Tabela 1) foram desenhados para a amplificação de fragmentos do genoma viral. O RNA extraído a partir das partículas virais purificadas como descrito por Maciel-Zambolim *et al.* (2003) foi utilizado como molde para a amplificação dos genomas. As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando 1 µg de cada RNA viral, 1 µl de olinucleotídeos randômicos (250 µM) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µl de dNTP mix 10mM. A desnaturação do dsRNA do PMeV foi realizada a 96 °C por 3 min enquanto a do ssRNA do PMeV2 a 70 °C por 10 min. Em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de enzima 5X First-Strand Buffer, 1 µl de DTT 0,1 M e 1 µl da enzima SuperScript III RT (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA) em um volume final de 20 µl. Posteriormente a amostra foi incubada a 50 °C por 1 h para a síntese do cDNA e 70 °C por 15 min para a desativação da enzima.

Nas reações de PCR foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hauppauge, USA). Na reação de PCR utilizou-se 1 µl de cada par de oligonucleotídeo a 10 µM, 5 µl de 10X PCR Buffer, 2,0 µl de MgSO₄ 50 mM, 1 µl de dNTP, 0,2 µl de Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2 µl do cDNA em um volume final de 50 µl. As reações foram realizadas utilizando o seguinte programa: 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, T_m * durante 30 s (Tabela 1), 72 °C durante 2,5 ou 1 minuto (para ~ 2000 pb e ~ 1000 pb, respectivamente), e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os fragmentos amplificados foram enviados para Macrogen para sequenciamento.

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos usados na detecção e na amplificação do genoma do PMeV e PMeV2.

Amplicon	Pares de oligonucleotídeos	Sequências	Tm*
A1	PMeV conv	F: 5' CTTGGTTAGGCATAACTGTAGGT 3' R: 5' CACGGACTCTTAGAAACGTCTATC 3'	60 °C
A2	PMeV2 conv	F: 5' CCAATGCCCATAAAGATAGCACT 3' R: 5' CTGAAATCGGAGGTCTTGTCATA 3'	60 °C
A3	PMeV real	F: 5' CCC GAT CCT GGT TTG AGA AA 3' R: 5' AGT TAA TAG GAG CAG TCG CTA AC 3'	60 °C
A4	PMeV2 real	F: 5' GAA GGC TGT AGA GAA ACC TGT C 3' R: 5' GCT GTC TCC TGG GCA TTA AA 3'	60 °C
A5	PMeV 1	F: 5' GGGCGTTGACCTGGATATG 3' R: 5' AGCCTGAGCCCATCTAGTAA 3'	55 °C
A6	PMeV 2	F: 5' GCTTTCCAGATTCATCGTTGTT 3' R: 5' GGTCTACTCTTTGAGCATCAG 3'	55 °C
A7	PMeV 3	F: 5' CACCTAGTATGGCAACGAATCA 3' R: 5' CCTAAAGGACTACTAATCGG 3'	55 °C
A8	PMeV 4	F: 5' GCTTGGGTGGTAAGACACAT 3' R: 5' CAGTGCTAATAACCTGATGT 3'	55 °C
A9	PMeV 5	F: 5' CTGATGTTAGGGCAGGATGTT 3' R: 5' ACAAGGAGGAAATAGGAGAA 3'	55 °C
A10	PMeV 6	F: 5' CACTGACCAGTTACTTA 3' R: 5' CTTGATCCGTTACTAGA 3'	50 °C
A11	PMeV 7	F: 5' GCTCCTCCATCTTTCTT 3' R: 5' GGAACCTTTGATACCTT 3'	53 °C
A12	PMeV2- 1	F: 5' GTGAATTATGTTGGCATACAACGAG 3' R: 5' GGTAGATGGTATACACACAATACAG 3'	62 °C
A13	PMeV2- 2	F: 5' CAAGTGGGATAAGTTCAGAGA 3' R: 5' CAACTCTCAAGCCTTTAGAT 3'	58 °C
A14	PMeV2- 3	F: 5' ATTCAAGTAGTGGAGCAGGCT 3' R: 5' CTGCGACTTGGTACTTAAAGG 3'	58 °C

4.3. Análise das sequências e filogenética

As sequências obtidas foram verificadas quanto à presença de ORFs usando Genemark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/eukhmm.cgi>). A previsão de estruturas secundárias e pseudo-nós foi realizada com o programa DotKnot (Sperschneider e Datta, 2010) utilizando como dado de entrada (input) a sequência de 100-nt

imediatamente a jusante do heptanucleotídeo na junção ORF1-ORF2 da fita codificadora do PMeV.

As sequências obtidas para cada ORF foram comparadas com as sequências de proteínas depositadas no GenBank utilizando a ferramenta BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). O programa MUSCLE (Edgar, 2004) foi utilizado para alinhar as sequências de aminoácidos do domínio conservado RdRP_4 (pfam02123) do PMeV, de 14 membros da família *Totiviridae* e de 10 vírus semelhantes aos totivírus (tabela 2); e para alinhar as sequências de aminoácidos da RdRp do PMeV2, 16 membros da família *Tombusviridae* e 3 vírus semelhantes aos umbravírus (tabela 3).

Tabela 2. Nome, sigla, número de acesso e classificação taxonômica dos vírus relacionados aos totivírus utilizados na análise filogenética.

Nome do vírus	Sigla	Nº de acesso	Classificação Taxonômica (família/gênero)
<i>Black raspberry virus F</i>	BRV-F	NC_009890	<i>Totiviridae</i> /unassigned
<i>Botryotinia fuckeliana totivirus</i>	BfV	AM491608	<i>Totiviridae</i> /unassigned
<i>Botrytis cinerea</i> RNA virus 1	BcRV-1	NC_026139	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Coniothyrium minitans</i> RNA virus	CmRV	NC_007523	<i>Totiviridae</i> / <i>Victorivirus</i>
<i>Diplodia scrobiculata</i> RNA virus 1	DsRV-1	NC_013699	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Eimeria brunetti</i> RNA virus 1	EbRV-1	NC_002701	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Fusarium graminearum</i> dsRNA mycovirus-3	FgV-3	NC_013469	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Fusarium virguliforme</i> dsRNA mycovirus 1	FvRV-1	JN671444	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Fusarium virguliforme</i> dsRNA mycovirus 2	FvRV-2	JN671443	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Giardia lamblia</i> virus	GLV	NC_003555	<i>Totiviridae</i> / <i>Giardiavirus</i>
<i>Gremmeniella abietina</i> RNA virus L1	GaV-L1	AF337175	<i>Totiviridae</i> / <i>Victorivirus</i>
<i>Gremmeniella abietina</i> RNA virus L2	GaV-L2	NC_005965	<i>Totiviridae</i> /unassigned
<i>Leishmania</i> RNA virus 1-1	LRV1-1	NC_002063	<i>Totiviridae</i> / <i>Leishmaniavirus</i>
<i>Leishmania</i> RNA virus 2-1	LRV2-1	NC_002064	<i>Totiviridae</i> / <i>Leishmaniavirus</i>
<i>Phlebiopsis gigantea</i> dsRNA 1	PgV-1	NC_013999	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Phlebiopsis gigantea</i> dsRNA 2	PgV-2	AM111097	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Phytophthora infestans</i> RNA virus 3	PiRV-3	JN603241	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> virus L-A	ScVL-A	NC_003745	<i>Totiviridae</i> / <i>Totivirus</i>
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> dsRNA mycovirus-L	SsNsV-L	NC_017915	Tentative <i>Totiviridae</i>
<i>Sphaeropsis sapinea</i> RNA virus 2	SsRV-2	NP_047560.1	<i>Totiviridae</i> / <i>Victorivirus</i>
<i>Tuber aestivum</i> virus 1	TaV-1	HQ158596	<i>Totiviridae</i> / <i>Totivirus</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i> virus 1-1	TVV-1	JF436869	<i>Totiviridae</i> / <i>Trichomonasvirus</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i> virus 2	TVV-2	HQ607514	<i>Totiviridae</i> / <i>Trichomonasvirus</i>
<i>Ustilago maydis</i> virus H1	UmV-H1	NC_003823	<i>Totiviridae</i> / <i>Totivirus</i>

Tabela 3 Nome, sigla, número de acesso e classificação taxonômica dos vírus relacionados aos umbravírus utilizados na análise filogenética.

<i>Beet black scorch virus</i>	BBSV	JN635328	<i>Tombusviridae/Betanecrovirus</i>
<i>Carrot mottle virus</i>	CMoV	NC_011515	<i>Tombusviridae/Umbravirus</i>
<i>Carrot mottle mimic virus</i>	CMoMV	NC_001726	<i>Tombusviridae/Umbravirus</i>
<i>citrus yellow vein-associated virus</i>	CYVaV	JX101610	Unassigned
<i>Cowpea mottle virus</i>	CPMoV	NC_003535	<i>Tombusviridae/Carmovirus</i>
<i>Galinsoga mosaic virus</i>	GaMV	NC_001818	<i>Tombusviridae/Gallantivirus</i>
<i>Groundnut rosette virus</i>	GRV	NC_003603	<i>Tombusviridae/Umbravirus</i>
<i>Maize chlorotic mottle virus</i>	MCMV	KF010583	<i>Tombusviridae/Machlomovirus</i>
<i>Melon necrotic spot virus</i>	MNSV	JX879088	<i>Tombusviridae/Carmovirus</i>
<i>Olive mild mosaic virus</i>	OMMV	AY616760	<i>Tombusviridae/Alphanecrovirus</i>
<i>Olive latent virus 1</i>	OLV-1	NC_001721	<i>Tombusviridae/Alphanecrovirus</i>
<i>Opium poppy mosaic virus</i>	OpPMV	NC_027710	<i>Tombusviridae/ unassigned</i>
<i>papaya meleira virus-Mx</i>	PMoV-Mx	KF214786	<i>Tombusviridae/ unassigned</i>
<i>papaya virus Q</i>	PpVQ	KP165407	<i>Tombusviridae/ unassigned</i>
<i>Pea enation mosaic virus-2</i>	PEMV-2	NC_003853	<i>Tombusviridae/Umbravirus</i>
<i>Tobacco bushy top virus</i>	TBTv	FM242700	<i>Tombusviridae/Umbravirus</i>
<i>Tobacco necrosis virus A</i>	TNV-A	GQ221829	<i>Tombusviridae/Alphanecrovirus</i>
<i>Tobacco necrosis virus D</i>	TNV-D	NC_003487	<i>Tombusviridae/Betanecrovirus</i>
<i>Turnip crinkle virus</i>	TCV	NC_003821	<i>Tombusviridae/Carmovirus</i>

As árvores filogenéticas foram construídas utilizando máxima verossimilhança e inferência bayesiana. As árvores de máxima verossimilhança foram construídas utilizando o programa MEGA6 (modelo de substituição: WAG + G + I) e com um bootstrap de 1.000 repetições para determinar a confiabilidade de cada ramo gerado na análise. A inferência Bayesiana foi realizada com MrBayes v. 3.0b4 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Os parâmetros iniciais foram estimados pelo AIC (Akaike Information Criterion) para cada conjunto de dados, utilizando o programa MrModelTest 2.2 (Nylander, 2004). As análises foram realizadas com 20.000.000 gerações, excluindo as primeiras 2.000.000 gerações como “burn-in”. As probabilidades posteriores foram usadas como valores de suporte para os agrupamentos gerados. As árvores foram visualizadas e editadas no programa Fig Tree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4.4. Purificação viral e caracterização das proteínas estruturais

Para a purificação das partículas virais associadas à meleira do mamoeiro o látex coletado a partir de frutos de mamão com sintomas da doença foi clarificado com Triton X-100 a 3% V/V durante 3 horas e centrifugado a 100 000 g durante 90 min através de um gradiente linear de sacarose 10-40% (m/v) conforme descrito por (Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). As partículas virais purificadas foram ressuspensas em tampão Tris-borato pH 9,0 e armazenados a 4 ° C. As suspensões virais foram submetidas a leitura em espectrofotômetro de luz ultravioleta, nos comprimentos de onda na faixa 220-320 nm, para avaliar a sua pureza. As partículas virais foram coradas negativamente por fosfotungstato de potássio 2% (m/v) pH 6,8 para visualização em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM-109.

Para identificação das proteínas estruturais, as partículas virais purificadas foram digeridas com tripsina conforme descrito por Shevchenko *et al.* (2006). Os peptídeos gerados foram analisados em MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics Ultraflex III, Billerica, MA, USA) e os peptídeos sequenciados comparados com a sequência de aminoácidos das proteínas preditas para o PMeV e PMeV2 utilizando MASCOT versão 2.4.0 (Matrix Science, Londres, Reino Unido). Os resultados obtidos foram validados utilizando o Scaffold versão 3.6.4 (Proteome Software, Inc.) com os algoritmos PeptideProphet (Keller *et al.*, 2002) e ProteinProphet (Nesvizhskii *et al.*, 2003) com o critério de aceitação de 99,9% de probabilidade de identificação de proteínas e 95% de peptídeos. A busca por sítios de clivagem de proteases na sequência predita para a proteína estrutural foi realizado através do programa NetPicoRNA 1,0 Server (Blom *et al.*, 1996).

4.5. Determinação do limiar de detecção dos vírus associados à meleira do mamoeiro por Multiplex RT-PCR e detecção em plantas assintomáticas

Para determinar o limiar de detecção do RNA viral do PMeV e do PMeV2 foi utilizado como molde o RNA extraído a partir das partículas virais purificadas como descrito por Maciel-Zambolim *et al.* (2003). As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando 1 µg de cada RNA viral, 1 µl de olinucleotídeos randômicos (250 µM) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µl de dNTP mix 10mM. A desnaturação do dsRNA do PMeV foi realizada a 96 °C por 3 min enquanto a do ssRNA do PMeV2 a 70°C por 10 min. Em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de enzima 5X First-

Strand Buffer, 1 µl de DTT 0,1 M e 1 µl da enzima SuperScript III RT (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA) em um volume final de 20 µl. Posteriormente a amostra foi incubada a 50 °C por 1 h para a síntese do cDNA e 70 °C por 15 min para a desativação da enzima. Uma curva padrão foi preparada utilizando diluições seriadas dos cDNAs obtidos (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} ng de cDNA por reação).

Nas reações de simplex PCR foi utilizada a enzima recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hauppauge, USA). Na reação de PCR utilizou-se 1,25 µl do primer PMeVconv. 10 µM ou 1,25 µl do primer PMeV2conv. 10 µM (Tabela 1), 2,5 µl de 10X PCR Buffer, 0,75 µl de $MgCl_2$ 50 mM, seguida de 0,5 µl de dNTP 10mM, 0,5 µl de recombinant Taq DNA Polymerase, 2 µl do cDNA em um volume de final de 25 µl. As reações foram realizadas utilizando o seguinte programa: 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, 60 °C durante 30 s (Tabela 1), 72 °C durante 1 minuto, e uma extensão final de 10 min a 72 °C. O tamanho dos amplicons são 394 pb para o PMeV e 754 pb para o PMeV2. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 0.8%.

Nas reações de Multiplex PCR utilizou-se 1,25 µl do primer PMeVconv. 10 µM, 1,25 µl do primer PMeV2conv. 10 µM (Tabela 1), 2,5 µl de 10X PCR Buffer, 0,75 µl de $MgCl_2$ 50 mM, seguida de 0,5 µl de dNTP 10mM, 0,5 µl de recombinant Taq DNA Polymerase, 2 µl do cDNA em um volume de final de 25 µl. As reações foram realizadas utilizando o seguinte programa: 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, 60 °C durante 30 s (Tabela 1), 72 °C durante 1 minuto, e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose a 0.8%.

4.6. Diagnóstico dos vírus associados à meleira do mamoeiro por RT-PCR

O RNA total foi extraído de amostras (Anexo 1) de látex utilizando o reagente Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi ressuspenso em 20 µl de água livre de nucleases e armazenado a -80 °C. A qualidade e pureza do RNA purificado foram avaliadas com base na relação A260/280 utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, Boston, MA, USA). O RNA extraído (1 µg) foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA tratado foi utilizado na síntese da fita de DNA complementar (cDNA). As reações de transcrição reversa

foram realizadas utilizando 10 µl do RNA tratado, 1 µl de olinucleotídeos randômicos (250 µM) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µl de dNTP mix 10mM. A desnaturação do dsRNA do PMeV foi realizada a 96 °C por 3 min enquanto a do ssRNA do PMeV2 a 70°C por 10 min. Em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de enzima 5X First-Strand Buffer, 1 µl de DTT 0,1 M e 1 µl da enzima M-MLV transcriptase reversa (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA) em um volume final de 20 µl. Posteriormente a amostra foi incubada a 37 °C por 50 min para a síntese do cDNA e 75 °C por 15 min para a inativação da enzima.

Nas reações de PCR foi utilizada a enzima recombinant Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hauppauge, USA). Na reação de PCR utilizou-se 1,25 µl de cada par de oligonucleotídeo 10 µM (Tabela 1), 2,5 µl de 10X PCR Buffer, 0,75 µl de MgCl₂ 50 mM, seguida de 0,5 µl de dNTP 10mM, 0,05 µl de recombinant Taq DNA Polymerase, 2 µl do cDNA em um volume de final de 25 µl. As reações foram realizadas utilizando o seguinte programa: 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 45 s, 62 °C durante 30 s (Tabela 1), 72 °C durante 1 minuto, e uma extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram visualizados em géis de agarose a 1,0%.

4.7. Avaliação do acúmulo viral relativo do PMeV e PMeV2 por qRT-PCR

O acúmulo do PMeV e PMeV2 nas amostras de látex foi avaliado por qRT-PCR. O RNA total foi extraído de 5 amostras de plantas assintomáticas e 5 sintomáticas utilizando o reagente Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi ressuspensão em 20 µl de água livre de nucleases e armazenado a -80 °C. A qualidade e pureza do RNA purificado foram avaliadas com base na relação A260/280 utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, Boston, MA, USA).

O RNA extraído (1 µg) foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA tratado foi utilizado na síntese da fita de DNA complementar (cDNA). As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando 1 µg do RNA total, 1 µl de olinucleotídeos randômicos (250 µM) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µl de dNTP mix 10mM. A desnaturação do dsRNA do PMeV foi realizada a 96 °C por 3 min enquanto a do ssRNA do PMeV2 a 70°C por 10 min. Em seguida foi adicionado 4 µl do tampão de enzima 5X First-Strand Buffer, 1 µl de DTT

0,1 M e 1 µl da enzima SuperScript III RT (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA) em um volume final de 20 µl. Posteriormente a amostra foi incubada a 50 °C por 1 h para a síntese do cDNA e 70 °C por 15 min para a desativação da enzima.

As quantidades do PMeV e do PMeV2 nas amostras coletadas foram avaliadas no equipamento 7500 Fast Real-time PCR (Life Technologies, Carlsbad, EUA) usando os iniciadores PMeV real e PMeV2 real (Tabela 1). As reações de qPCR foram realizadas utilizando 50ng de cDNA, cinco microlitros (5 µL) de SYBR Green PCR Kit Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e 1 µL de cada par de oligonucleotídeo 10 µM. Essa mistura foi incubada a 95 °C por 10 min seguida por 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

A quantidade relativa de vírus nas amostras foi estimada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para a análise o gene para o fator de iniciação da tradução (eIF4E) foi usado como gene de referência. Este gene foi previamente estabelecido como um possível gene para a normalização. Cada amostra foi analisada em duplicata.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação e sequenciamento de genomas virais associados à meleira

O RNA total foi extraído a partir do látex coletado de frutos com sintomas típicos de meleira do mamoeiro. Após eletroforese em gel de agarose 1%, duas bandas puderam ser visualizadas, uma de aproximadamente 10 kpb, correspondente ao dsRNA do PMeV (denominado PMeV-ES) e uma segunda banda de aproximadamente 4,5 kpb (Figura 6). Ambas as bandas de RNA foram purificadas a partir do gel e enviadas para o sequenciamento na Macrogen Inc. utilizando a plataforma 454 FLX (Roche).

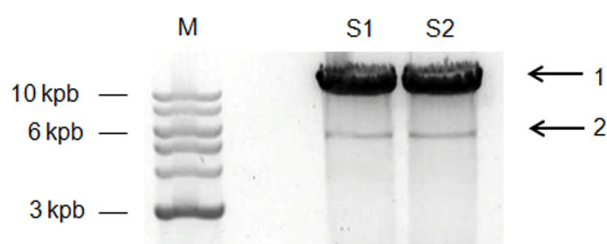


Figura 6. Padrão de bandas obtido a partir do RNA total extraído do látex de mamoeiros infectados pelo PMeV. S1, Banda correspondente ao RNA do PMeV. S2, Banda de RNA de aproximadamente 4,5 kbp. S1 e S2 são diferentes amostras de látex. M, marcador molecular [1 kb DNA ladder (Biolabs), in kpb].

Os dados obtidos a partir do sequenciamento do RNA viral foram 54.602 leituras e 22.706.988 nucleotídeos, com uma média de tamanho das leituras de 415 nucleotídeos. Antes da montagem das leituras é necessária a filtragem dos dados, processo de limpeza das sequências geradas. Ela é responsável pela remoção de regiões de baixa qualidade que acarretam em uma alta incidência de erros nas análises dos dados. Um limite mínimo de 20 para o valor de phred (estimativa da qualidade do nucleotídeo sequenciado) foi utilizado na montagem do genoma. Após a filtragem, 52.638 leituras foram utilizadas como dado de entrada para a montagem dos contigs.

A montagem é o processo de alinhamento por similaridade de duas ou mais sequências e a formação de contigs. Ela se faz necessária devido à quebra do DNA

durante o processo de sequenciamento. Na ausência de um genoma de referência é necessário realizar uma montagem “*De novo*” do genoma.

Nos contigs montados foram utilizadas 49.286 leituras e esses foram comparados com as sequências disponíveis no GenBank utilizando a ferramenta BLASTX. O resultado indicou que é possível separar os contigs em dois grupos, cada um mostrando identidade com diferentes sequências virais. Um grupo mostrou menor e-value com a proteína estrutural do PMeV-RN (KT013296) e com a RdRp do micovírus *Phlebiopsis gigantea mycovirus dsRNA-2* (PgV-2; AM111097), um vírus de dsRNA relacionado a membros da família *Totiviridae*. O outro grupo mostrou menor e-value com a RdRp do papaya virus Q (PpVQ; KP165407), um vírus do mamoeiro recentemente relatado no Equador e com o PMeV-Mx (isolado mexicano do PMeV), ambos relacionados com membros do gênero *Umbravirus*.

Portanto, a banda de aproximadamente 4,5 kb não é um RNA viral subgenômico transcrito durante o processo de infecção viral pela RdRp para a expressão das proteínas virais, como previamente sugerido por Kitajima *et al.* (1993) e Maciel-Zambolim *et al.* (2003). O segundo RNA purificado de plantas com sintomas de meleira corresponde a um vírus relacionado aos umbravírus e não apresenta identidade com o dsRNA do PMeV. A validação dos dados obtidos foi realizada através do sequenciamento de Sanger.

5.2. Organização genômica e características dos vírus associados à meleira

A sequência parcial obtida para o PMeV-ES é de 8.814 nucleotídeos (nº de acesso KT921784). Entretanto, em trabalhos anteriores, o tamanho do dsRNA do PMeV havia sido estimado entre 10-12 kpb por eletroforese em gel de agarose (Kitajima *et al.*, 1993; Maciel-Zambolim *et al.*, 2003). Estes estudos utilizaram um marcador de DNA dupla fita (dsDNA) para a determinação do comprimento de um dsRNA. A mobilidade eletroforética mais baixa do dsRNA, em comparação com a do dsDNA, (Livshits *et al.*, 1990), pode explicar a diferença no tamanho estimado do dsRNA do PMeV e do observado nos estudos anteriores e na sequência do genoma obtida neste trabalho e por Abreu *et al.* (2015).

Duas ORFs foram preditas na mesma fita de RNA do PMeV mas em diferentes fases de leitura (Figura 7). A ORF1 (nt 615-5306) codifica para um polipeptídeo putativo de 1.563 aminoácidos com uma massa molecular prevista de 177,6 kDa. Este

polipeptídeo apresentou 75% de identidade com a proteína correspondente codificada pelo PMeV-RN e de 20 a 29% de identidade com as proteínas correspondentes dos micovírus *Sclerotinia sclerotiorum nonsegmented virus-L* (SsNsV-L; NC_017915), *Botrytis cinerea RNA virus-1* (BcRV-1; NC_026139), *Fusarium virguliforme dsRNA mycovirus-1* (FvRV-1; JN671444), *Fusarium graminearum dsRNA mycovirus-3* (FgV-3; NC_013469) e *Phytophthora infestans RNA virus 3* (PiRV-3; AEX87901.1). Surpreendentemente, essas proteínas putativas não possuem domínios conservados descritos no banco de dados de proteínas. Apesar, de vários protocolos de purificação terem falhado na obtenção de partículas virais do PiRV-3 (Cai *et al.*, 2013) e do PgV-2 (Kozlakidis *et al.*, 2009), a ORF1 desses vírus, assim como para os totivírus, é proposta de ser uma proteína estrutural.

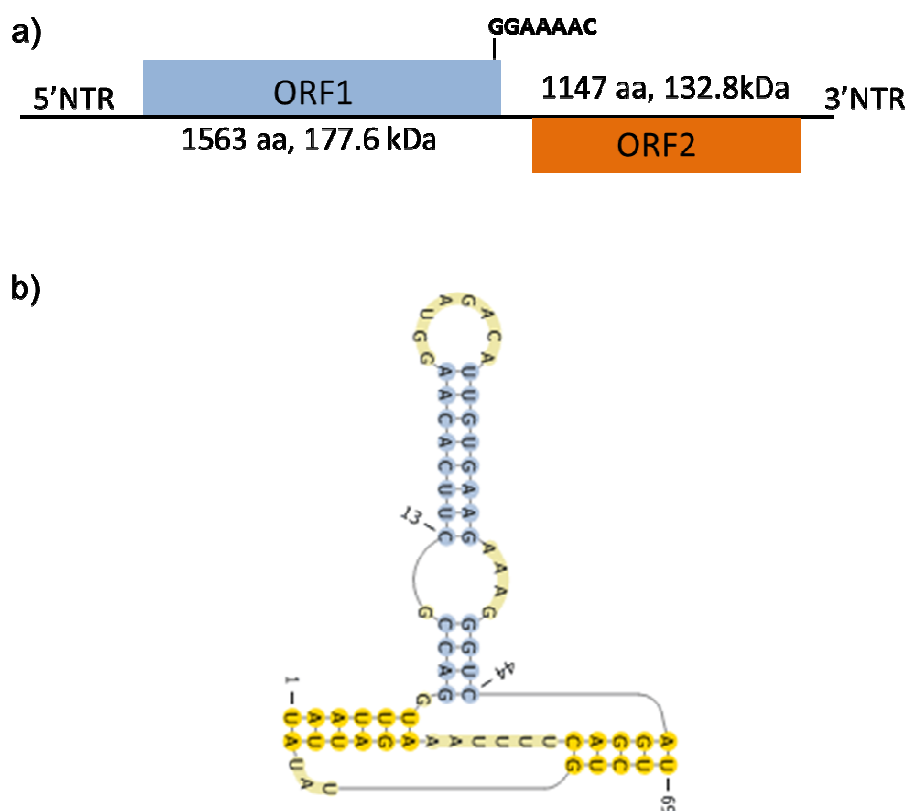


Figura 7. Organização genômica e características moleculares do papaya meleira virus (PMeV). (a) Representação esquemática da organização genômica do PMeV. O dsRNA viral possui duas ORFs em diferentes fases de leitura. A ORF1 codifica uma putativa proteína capsial (CP) e a ORF2 codifica uma putativa RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A posição do heptanucleotídeo necessário para a mudança de fase ribossomal está indicada na extremidade 3' da ORF1. (b) A estrutura secundária de pseudo-nó predita localizada à jusante do heptanucleotídeo.

Os totivírus contêm tipicamente duas ORFs que são traduzidas como uma única poliproteína por uma mudança de fase ribossomal. Analisando a sequência do PMeV-ES foi possível identificar uma sequência de heptanucleotídeos (GGAAAAC) com início na posição 5.297 e término na posição 5.303, imediatamente antes do códon de parada da ORF 1 (Figura 7a). A mesma sequência está presente no PMeV-RN, e sequências semelhantes foram identificados em cinco dos vírus mais estreitamente relacionados com o PMeV (PgV-2, FgV-3, PiRV-3, SsNsV-L e BcRV-1). Nestes vírus, os heptanucleotídeos preditos diferem da sequência consenso XXXYYYZ, onde X representa qualquer nucleotídeo, Y representa A ou U, e Z representa A, C ou U (Alam *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). Além do heptanucleotídeo, uma estrutura secundária estável, tal como um pseudo-nó ou um grampo, é essencial para a mudança de fase de leitura ribossomal (Brierley *et al.*, 2007). O PMeV-ES possui uma estrutura de pseudo-nó predita a jusante do códon de parada da ORF1 (Figura 7b).

A ORF2 predita (5.366-8.809 nt) codifica para uma proteína putativa de 1.147 aminoácidos com uma massa molecular prevista de 132,8 kDa e 67% de identidade com a proteína correspondente do PMeV-RN. Esta proteína possui o domínio conservado de RdRp superfamília 4 (pfam02123: RdRP_4), que inclui a RdRp de luteovírus, rotavírus e totivírus. A RdRp do PMeV-ES possui oito motivos (I a VIII) (Figura 8), que são conservados nas RdRps dos vírus BcRV-1, FgV-3, FvRV-1, PgV-2, PiRV-3 e SsNsV-L. A proteína tem 32% de identidade com as RdRps dos vírus PgV-2 e FgV-3, 31% de identidade com as RdRps dos vírus BcRV-1 e SsNsV-L, e 29% de identidade com a RdRp do FvRV-1. Outros membros da família *Totiviridae* mostraram semelhança com a RdRp do PMeV mas com uma menor cobertura e identidade.

	Motif I	Motif II	Motif III	Motif IV	Motif V
PMeV	LLGPS (80)	WSASGG (50)	YERKGNRVINWNTS (59)	CGLMFDYSDFNINHSI (59)	MRSLESGERGTSFINT
PgV2	LPGPS (72)	WAASGG (50)	FEKGRRAIWNTA (54)	VGLMWDYSDFNINHQK (60)	LRCLASGERATSFTNT
FgV3	LPGRS (72)	WAASGG (52)	YEPGKLRSILNTS (47)	VGLMWDYADFNIHNTF (59)	VRSLQSGERATSWINT
BcRV1	LVGRS (75)	WGASGG (52)	FEPGKLRSILNTS (47)	VGFMWDYADFNIHNTF (60)	KRSLQSGERATMWVNT
SsNsV-L	LVGRS (75)	WGASGG (52)	FEPGKLRSILNTS (47)	VGFMWDYADFNIHNTF (60)	KRSLQSGERATMWVNT
FvV1	LVGRT (76)	WGASGG (57)	FEAGKLRSILNTT (47)	VGFMWDYADFNIHNTF (59)	MRGLQSGERDTSRVNS
PiRV3	MMGRS (71)	WVSSGS (52)	FEPGKRRAIWNTG (48)	IGVMWDYSDFNINHLL (53)	KRSLMTGVRGTSFVNT

	Motif VI	Motif VII	Motif VII	
(27)	LQGDDVFSVTNS (10)	FNCLGYAGQPFKIG (6)	GEFLRLSYDP (6)	GYPIRSCAGLVSG
(27)	QQGDDVFRAVDS (10)	YNLLGYAGQSYKVT (6)	GEFLRLSYDG (6)	GYPIRAGLGLISG
(27)	KTGDDVFLTVPS (10)	YNLCGCAGQVSKIF (10)	GEFVRYGYDA (6)	GYPLRALTGLVHG
(27)	KTGDDVFLTTRT (10)	YNLCGAAGQAHKIL (10)	GEFVRYAYDA (6)	GYPLRALAGVVHG
(27)	KTGDDVFLVTKT (10)	YNLCGAAGQAHKIL (10)	GEFVRYAYDA (6)	GYPLRALAGVVHG
(27)	ASGDDAFELTNS (10)	YNLSGSAGQVHKVS (10)	GEFLRLHYDA (6)	GYPIRAMVGFSG
(27)	AFGDDVFSADS (10)	MNTLGTAGTTYKIN (3)	GELLRVSYDE (4)	GYPLRALVGLVSG

Figura 8. Alinhamento do domínio RdRp4 do PMeV e vírus relacionados. Alinhamento da sequência de aminoácidos do domínio RdRp4 (pfam02123) identificado na ORF2 do papaya meleira vírus (PMeV) com as regiões correspondentes dos seis vírus semelhantes totivírus mais estreitamente relacionados com o PMeV (na Tabela 2 a lista com o nome completo dos vírus e o n° de acesso no GenBank). As sequências foram alinhadas no MUSCLE (Edgar, 2004). Os números entre parênteses indicam o número de resíduos de aminoácidos separando os motivos individuais. Os resíduos de aminoácidos marcados em preto são conservados entre todas as sequências alinhadas.

A sequência parcial obtida para o RNA semelhante aos umbravírus é de 4.515 nucleotídeos (n° de acesso KT921785), e contém duas ORFs preditas em diferentes fases de leitura (Figura 9). A sequência de nucleotídeos tem 70% e 71% de identidade com o PpVQ e o PMeV-MX, respectivamente. As sequências do PpVQ e o PMeV-Mx são 79% idênticas.

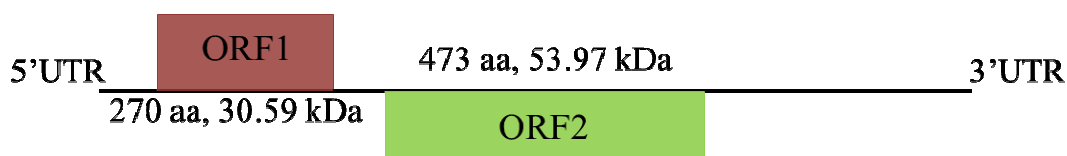


Figura 9. Representação esquemática da organização genômica do papaya umbravirus (PMeV2). O ssRNA viral possui duas ORFs em diferentes fases de leitura. A ORF1 codifica para uma proteína hipotética e a ORF2 codifica para uma putativa RdRp.

A ORF1 predita (nt 4-816) codifica um polipeptídeo de 270 aminoácidos com uma massa molecular prevista de aproximadamente 31 kDa. Esta proteína possui 48% de identidade com as proteínas correspondentes do PMeV-Mx e PpVQ. A busca no

banco de dados de proteínas por domínios conservados nas sequências de aminoácidos preditas não apresentou nenhum resultado significativo.

A ORF2 predita (nt 978-2399) codifica para uma proteína de 473 aminoácidos com uma massa molecular prevista de 53,97 kDa. Esta proteína contém o domínio conservado de RdRp superfamília 3 (pfam 00998: RdRP 3), que inclui a RdRp de vários vírus de plantas. O produto da ORF2 possui 73% de identidade com a RdRp do PpVQ, 66% de identidade com a RdRp do PMeV-MX, 43% de identidade com a RdRp do *Citrus yellow vein-associated virus* (CYVaV; JX101610), 43% de identidade com a RdRp do umbravírus *Carrot mottle mimic virus* (CMV; NC_001726) e identidade de 40% à RdRp do umbravírus *Carrot mottle virus* (CMOV; NC_011515). Outros membros do gênero *Umbravirus* também apresentaram similaridade com a putativa RdRp do PMeV-ES.

O resultado das comparações de sequências indicam que o RNA de aproximadamente 4,5 kb detectado em plantas com sintomas da meleira do mamoeiro corresponde a um vírus semelhante a umbravírus estreitamente relacionado com o PMeV-Mx e o PpVQ. No entanto, considerando que as sequências completas do PMeV-Mx e do PpVQ ainda não foram determinadas e que as porcentagens de identidade de nucleotídeos (70-79%) entre as sequências disponíveis estão próximas ao limite determinado para a demarcação de espécies no gênero *Umbravirus* (Ryabov *et al.*, 2012), ainda não é possível afirmar se estes vírus são diferentes isolados da mesma espécie ou espécies distintas. Assim, neste momento, foi decidido mencionar o segundo vírus de RNA isolado de plantas com sintomas da meleira como papaya umbravirus (PMeV2-ES). A determinação da sequência completa dos três isolados é necessária para esclarecer a classificação taxonômica.

5.3. Análises Filogenéticas

A árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos do domínio RdRp4 da replicase foi construída para avaliar a relação evolutiva entre o PMeV, 14 membros da família *Totiviridae*, e 10 vírus relacionados aos totivírus (tabela 2). Na árvore obtida, o PMeV e os vírus relacionados aos totivírus formaram um clado com forte suporte estatístico, distinto de todos os outros vírus da família *Totiviridae* (Figura 10). Dois grupos principais puderam ser reconhecidos dentro deste clado, um grupo

correspondente ao PMeV-ES, PMeV-RN, PgV-2 e DsRV-1, e o outro ao FvRV-1, FvRV-2, BcRV-1, SsNsV-L e FgV-3. O PMeV e estes vírus parecem estar mais estreitamente relacionados com os vírus do gênero *Totivirus* do que com os vírus que infectam protozoários e fungos dos gêneros *Giardiavirus*, *Victorivirus*, *Trichomonasvirus* and *Leishmanivirus*.

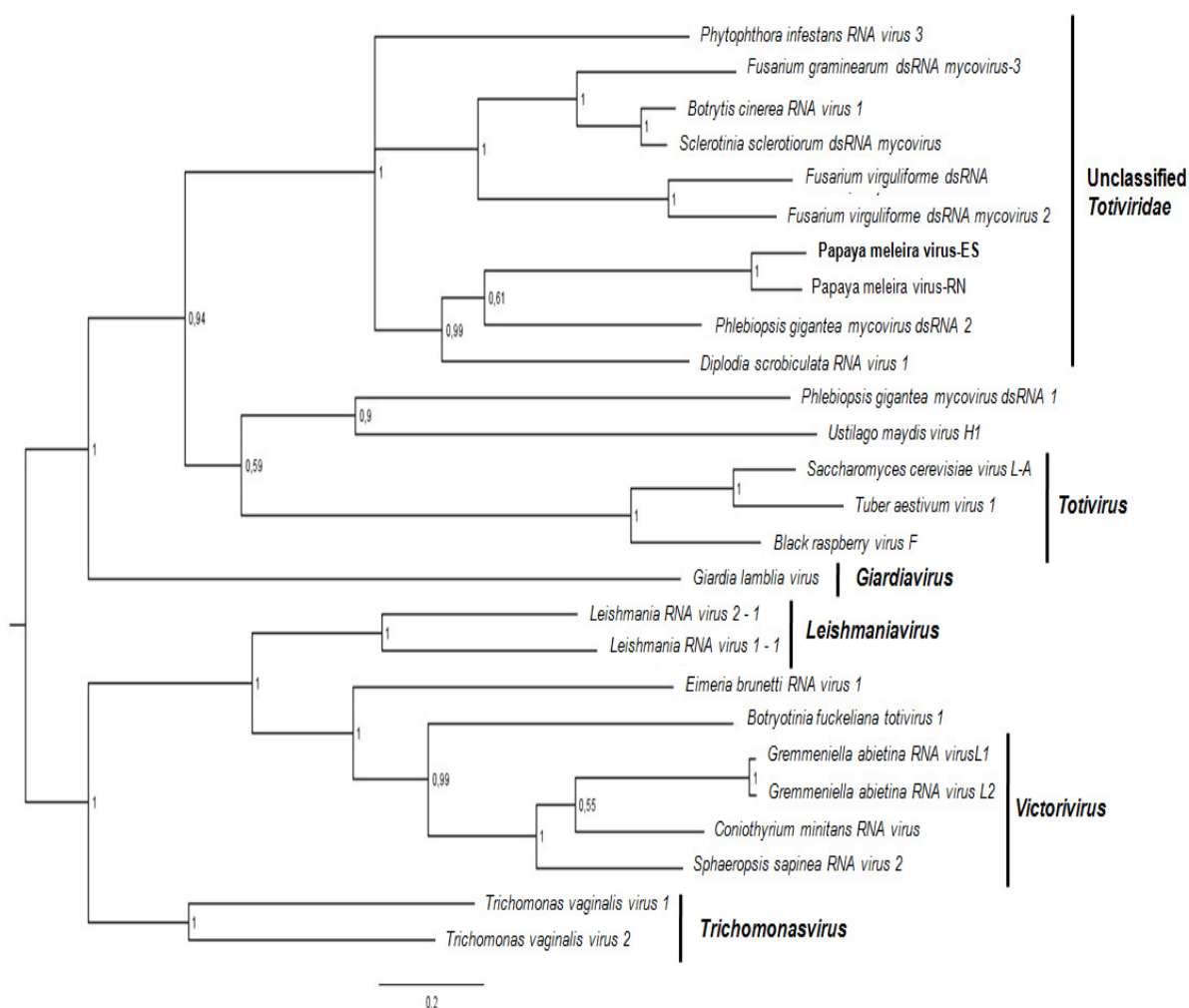


Figura 10. Relação filogenética entre o PMeV e vírus relacionados. Árvore filogenética baseada no alinhamento das seqüências de aminoácidos do domínio RdRp4 da replicase do papaya meleira vírus (PMeV), de vírus relacionados aos totivirus e de membros da família *Totiviridae*. A árvore foi obtida pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade a posteriori estão indicados em cada nó da árvore. Os nomes do vírus utilizados na análise e seus respectivos n° de acesso no Genbank estão listados na Tabela 2.

A árvore filogenética com base na seqüência de aminoácidos deduzida para a RdRp foi construída para avaliar a relação evolutiva entre PMeV2-ES, PpVQ, PMeV-Mx e 16 membros da família *Tombusviridae* (Tabela 3). A árvore filogenética mostrou dois ramos principais: um formado por PMeV2-ES, CYVaV, PpVQ, PMeV-Mx e membros

do gênero *Umbravirus*, e outro formado por vírus dos gêneros *Gallantivirus*, *Alphanecrovirus*, *Machlomovirus*, *Carmovirus* e *Betanecrovirus* (Figura 11).

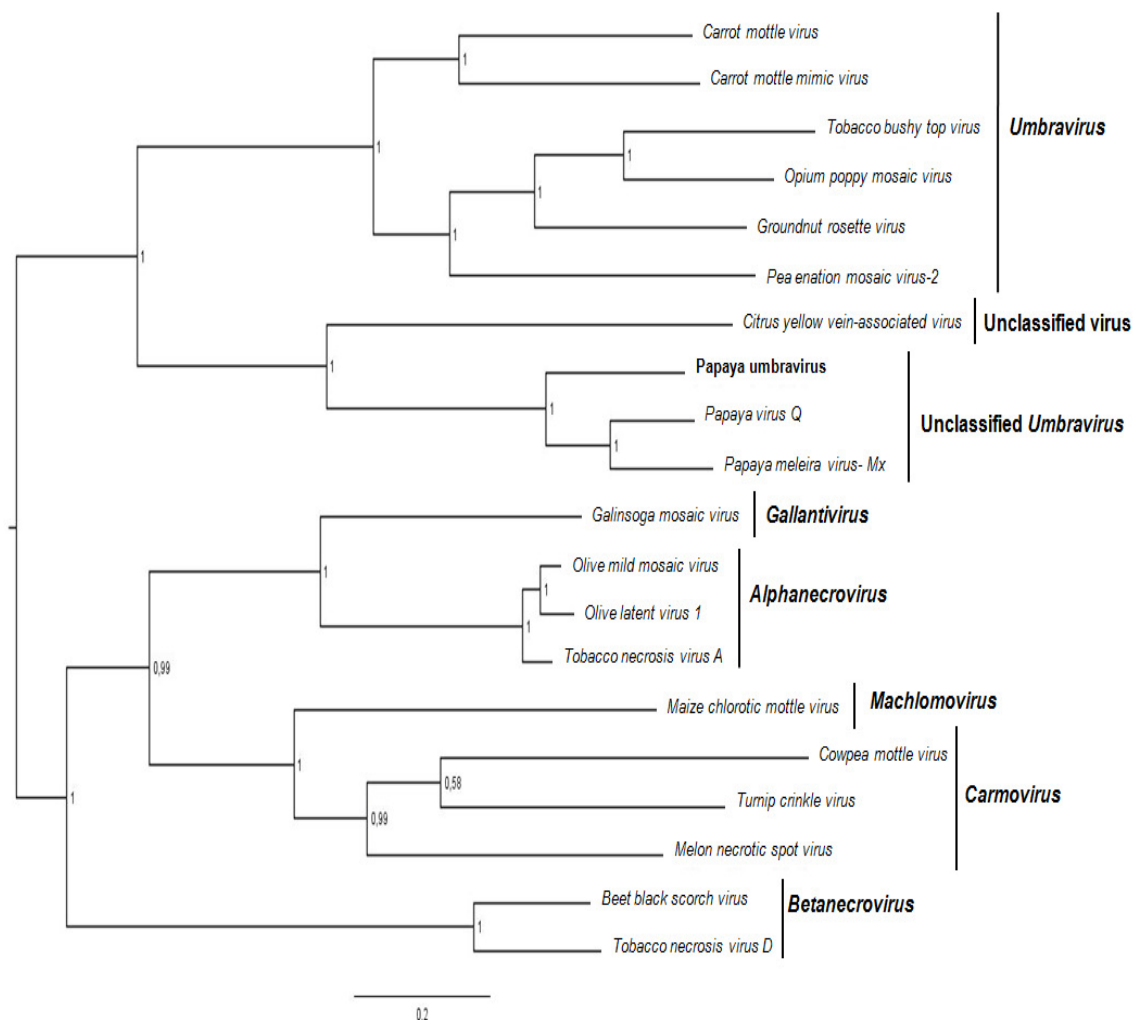


Figura 11. Relação filogenética entre o PMeV2 e vírus relacionados. Árvore filogenética baseada no alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína RdRp do papaya umbravirus (PMeV2) e de membros da família *Tombusviridae*. A árvore foi obtida pelo método de Inferência Bayesiana. Os valores de probabilidade a posteriori estão indicados em cada nó da árvore. Os nomes do vírus utilizados na análise e seus respectivos n° de acesso no Genbank estão listados na Tabela 2.

É relevante destacar que o PMeV2, PpVQ e PMeV-Mx formam um clado distinto dos outros vírus utilizados na análise, com um elevado suporte estatístico (Figura 11). Os mesmos resultados foram obtidos usando o método da máxima verossimilhança indicando que os grupos identificados são robustos e não dependem da escolha do modelo evolutivo e dos vários algoritmos empregados na construção de árvore (Anexos 2 e 3).

5.4. Purificação da partícula viral e caracterização do RNA viral e das proteínas estruturais

Estudos anteriores de microscopia eletrônica revelaram a presença de um único tipo de partícula viral (isométrica, 42 nm de diâmetro) em plantas de mamoeiro com a meleira. Para confirmar a associação de dois RNAs genômicos distintos a estas partículas, elas foram purificadas em gradiente de densidade de sacarose. A observação cuidadosa do gradiente indicou a presença de três zonas opalescentes bem definidas (Figura 12a). As três frações foram cuidadosamente recolhidas e visualizadas separadamente por MET (Figura 12b). Confirmando os dados anteriormente obtidos por Maciel-Zambolim *et al.* (2003), foram observadas partículas com a mesma dimensão e morfologia em todas as frações. No entanto, quando o RNA extraído a partir de cada fração foi submetido à eletroforese, uma banda de aproximadamente 4,5 kb foi visualizada a partir da fração intermediária, enquanto uma banda de aproximadamente 9 kb foi visualizada a partir da fração inferior (Figura 12c).

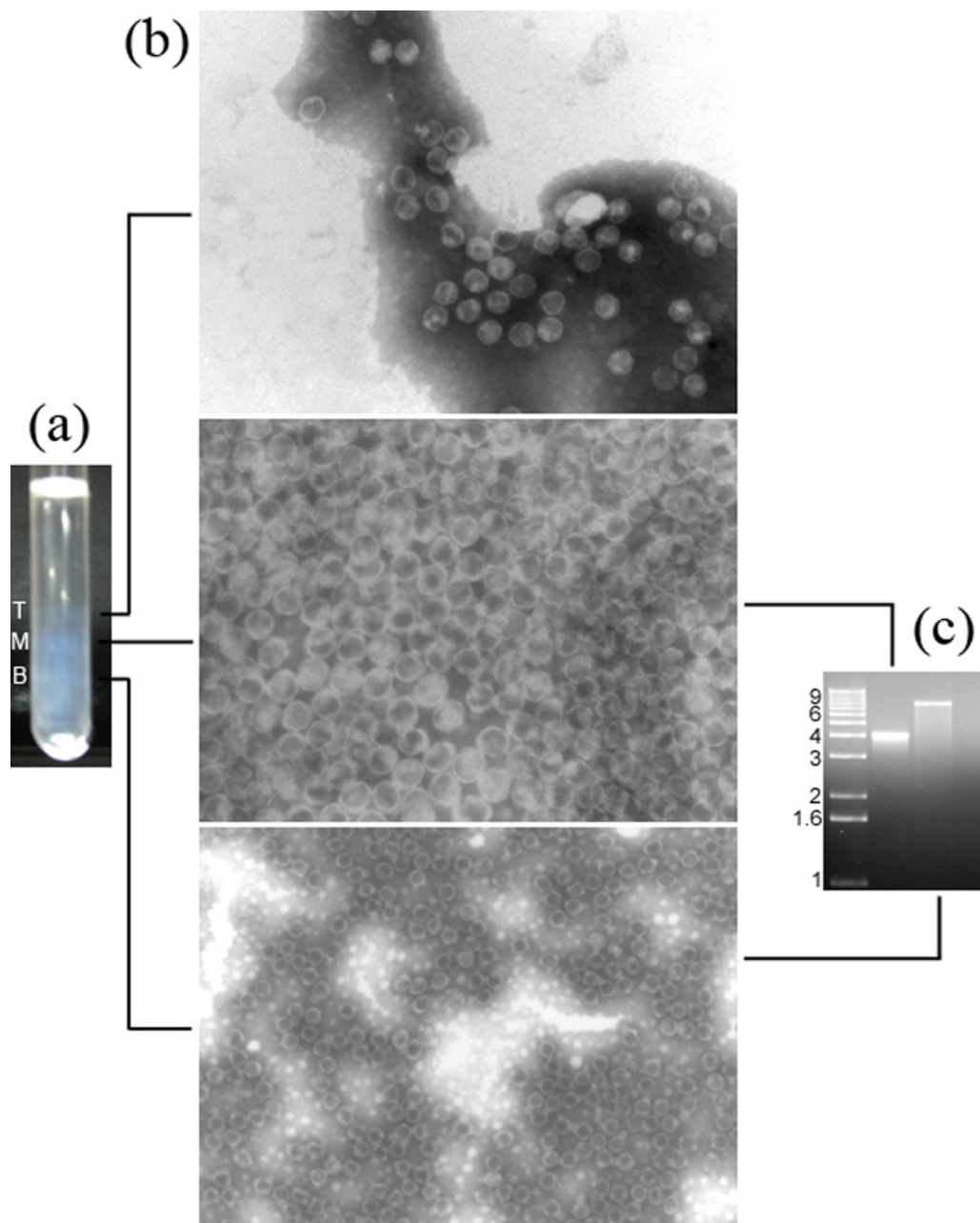


Figura 12. Análise das partículas virais purificadas a partir do látex de frutos de mamoeiros com sintomas da melecra. (a) Frações virais obtidas após a centrifugação em gradiente de densidade de sacarose. T, topo; M, meio. B, baixo. (b) Imagens das partículas virais presentes em cada fração, T, M e B, por Microscopia Eletrônica de Transmissão. As imagens das frações T e M, com 140,000x e a imagem da fração B, com 85,000x. (c) Eletroforese em gel de agarose do RNA extraído a partir das partículas presentes nas frações M e B. Não foi visualizado RNA a partir das partículas presentes na fração T. No primeiro poço da esquerda visualiza-se o marcador molecular [1 kb plus DNA ladder (Invitrogen), em kpb].

Para identificar as proteínas estruturais presentes nas partículas virais purificadas foi realizado o sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massa. Foram identificados um total de nove peptídeos, 100% idênticos à sequência do polipeptídeo codificado pela ORF1 do PMeV-ES (Figura 13). Os peptídeos

sequeenciados abrangem a região central da proteína, do aminoácido 356 ao 785, e correspondem a 8% da sequência de aminoácidos (125 de 1563 aminoácidos) da proteína predita.

(a)

Peptide sequence	Previous amino acid	Next amino acid	Best Mascot Ion score	Start	End
QTELFTEFPR	R	E	62,4	356	365
KTIDEAFQIHR	R	C	80,9	433	443
FNQVYDLYNNVSSGQSYVR	R	L	173	464	482
WAQAQMAQVLNER	R	N	96,9	491	503
EFKPQNLQWEYTSNNVAVR	K	R	123	511	529
IQNGSAFFLDAEGLSHDVIR	K	E	164	577	596
DLINVNFDPGLR	R	N	68,5	661	673
LAFELVMSR	R	M	53	723	731
FIQPTGANELR	R	L	42,5	785	795

(b)

301	LGNSQLIPSE	YLLSNDYEGL	EYSYDRYFGT	IPQSFIFSPA	DLKLDVDNKV
351	ITVNR QTELF	TEF PREVCRL	SETSYTNQEY	IIMSSINQAK	ANSYKVKRLA
401	SGLVTKDNIP	ILPQYSSCMD	VIKGRDISPS	AR KTIDEAFQ	IH RCYGTNVS
451	RSGSSYETLR	RSR FNQVYDL	YNNVSSGQSY	VR LYRLFTR	WAQAQMAQVL
501	NER NTIYSPK	E FKPQNL QWE	Y TSNNVAVRR	DSVHYLASTG	DGKYGNILKG
551	NYNFGNNHIY	DGEYSLFGHA	TDMFRK IQNG	SAFFLDAEGL	SHDVIREICC
601	CAIDINEFNQ	PWLGITVGSD	DTHVLTKFT	IPGLYYQCEG	VSDIIHWWGA
651	TEPEDVIPLR	DLINVNFDP	GLR NSTGQLS	DNNLPWPEFT	NFGLATAPIN
701	LSTIEEAIRI	MVARTHSAEE	AR LAFELVMS	R MLMIDVSKS	PCYNGNQDSP
751	TGSTLNETHY	PLSTEWHRRES	NTSHIEKANA	HKS RFIQPTG	AN ELRLPYVF
801	SGLAYDFDMF	HEMTIPSPLW	EATIMKGNQF	INHSFIITHA	LSVSINWPSH

Figura 13. Mapa peptídico da proteína estrutural (CP) do PMeV e PMeV2 identificado na sequência de aminoácidos predita para a proteína codificada pela ORF1 do PMeV. (a) Lista dos nove peptídeos identificados por espectrometria de massa, incluindo os valores de escore fornecidos pelo MASCOT e a posição de início e término dentro da sequência de aminoácidos predita para a ORF1. (b) Destacam-se em vermelho os nove peptídeos identificados e listados na letra (a) na sequência de aminoácidos para a porção central da ORF1. Todos os nove peptídeos apresentam 100% de identidade com a sequência de aminoácidos predita para a ORF1 do PMeV. A sequência completa da ORF1 do PMeV é 1563 aminoácidos.

Este resultado indica que a proteína traduzida da ORF1 do PMeV sofre auto-clivagem ou é clivada por proteases do látex do mamoeiro, e que o(s) produto(s) da clivagem compreende(m) as proteínas estruturais virais. A predição de sítios de clivagem nas posições 313 e 1427 da sequência deduzida de aminoácidos da ORF1 do PMeV resultaria em uma CP madura, com uma massa molecular prevista de aproximadamente 122 kDa. No entanto, as proteínas do capsídeo de vírus isométricos e não envelopados são geralmente menores (17-40 kDa) (Speir e Johnson, 2008). Outros sítios de clivagem adicionais com sequência consenso atípica podem estar presentes e não terem sido detectados pelos algoritmos utilizados.

5.5. Diagnóstico por multiplex RT-PCR do PMeV e PMeV2

No ensaio para determinação do limiar de detecção do PMeV e do PMeV2, os RNAs virais extraídos das partículas purificadas foram utilizado como molde para a síntese do cDNA. Os cDNAs obtidos foram submetidos à diluição seriada até a concentração 10^{-6} (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} ng de cDNA por reação).

No ensaio de simplex RT-PCR foi possível visualizar a banda de amplificação do PMeV até a diluição com concentração 10^{-6} (Figura 14), enquanto para o PMeV2, foi possível visualizar a banda da amplificação até a diluição com concentração 10^{-5} (Figura 14).

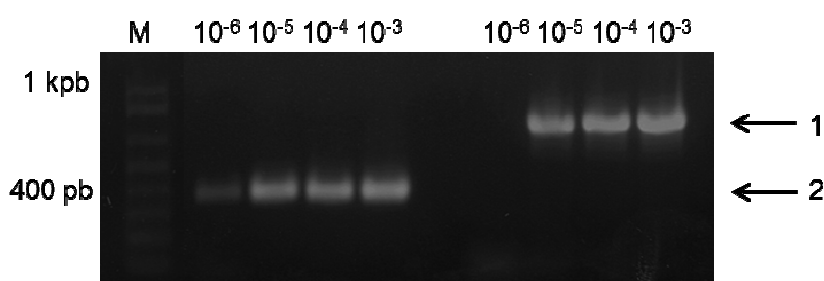


Figura 14. Limite de detecção do PMeV e do PMeV2 por RT-PCR. O cDNA correspondente a cada genoma viral foi diluído nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . 1- Banda correspondente a amplificação do PMeV2. 2- Banda correspondente a amplificação do PMeV. M - Marcador molecular [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].

Entretanto, no ensaio para a determinação dos limiares de detecção do PMeV e do PMeV2 por multiplex RT-PCR, ainda foi possível detectar a banda de amplificação do PMeV até a diluição com concentração 10^{-6} (Figura 15), mas a banda de amplificação do PMeV2 apenas até a diluição de 10^{-4} .

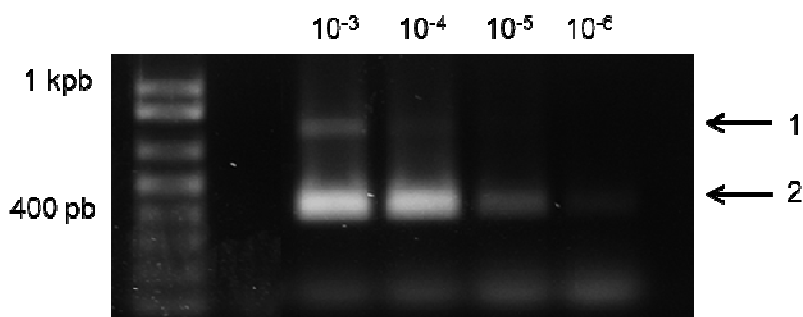


Figura 15. Limite de detecção do PMeV e do PMeV2 por multiplex RT-PCR. Os cDNAs correspondentes a cada genoma viral foram diluídos nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . 1- Banda correspondente a amplificação do PMeV2. 2- Banda correspondente a amplificação do PMeV. M - Marcador molecular [1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)].

5.6. A meleira do mamoeiro está associada a presença de dois vírus, PMeV e PMeV2

Para verificar se a meleira do mamoeiro está associada com a infecção mista pelo PMeV e PMeV2, 54 amostras de látex de plantas sintomáticas e 45 amostras de látex de plantas assintomáticas foram coletadas e analisadas quanto a presença dos vírus por RT-PCR (Anexo 1). A presença de ambos, PMeV e PMeV2, foi confirmada para todas as plantas sintomáticas. Das 45 plantas assintomáticas, em 36 plantas apenas o PMeV foi detectado, enquanto em nove plantas a presença dos dois vírus foi confirmada. As nove plantas assintomáticas infectadas pelo PMeV e PMeV2 e sete plantas assintomáticas infectadas somente pelo PMeV foram monitoradas por 3 meses após o diagnóstico, e eventualmente, todas as nove desenvolveram sintomas típicos de meleira, enquanto as sete infectadas pelo PMeV permaneceram assintomáticas.

5.7. Acúmulo Viral Relativo do PMeV e PMeV2

Para verificar se a ausência de sintomas está relacionada com o menor acúmulo do PMeV e do PMeV2 e/ou com um acúmulo diferencial dos dois vírus, o RNA total foi extraído de plantas assintomáticas e sintomáticas e utilizado como molde para análise do acúmulo viral por qPCR. Os resultados demonstraram que o acúmulo do PMeV2 é superior nas plantas sintomáticas em relação as plantas assintomáticas (Figura 16). Enquanto o acúmulo do PMeV é inferior em ambas as plantas em relação ao PMeV2 e não apresentou diferença entre os dois tratamentos.

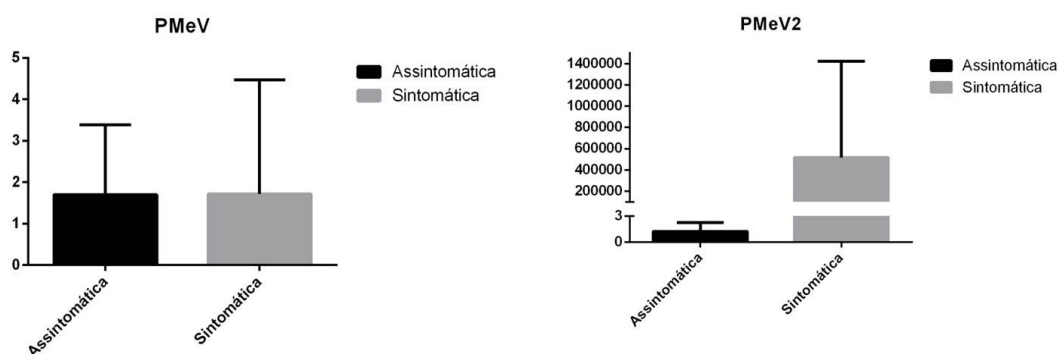


Figura 16. Quantificação relativa do acúmulo do PMeV e PMeV2 em mamoeiros assintomáticos e sintomáticos para a meleira. Quantificação relativa do PMeV e PMeV2 por qRT-PCR. O gene que codifica para eIF4 foi usado para normalização e o acúmulo do PMeV e PMeV2 nas plantas sintomáticas foi calculado em relação a expressão nas plantas assintomáticas.

6. DISCUSSÃO

Estudos iniciais analisando as plantas com sintomas típicos da meleira foram baseados na extração do RNA total a partir do látex de frutos utilizando solventes orgânicos, seguido de eletroforese em gel para visualização das bandas de dsRNA resultantes (Kitajima *et al.*, 1993; Maciel-Zambolim *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2005). Normalmente, duas bandas podem ser visualizadas, uma de aproximadamente 10 kpb correspondendo ao dsRNA do PMeV, e uma segunda banda de aproximadamente 4,5 kb. A sequência obtida do dsRNA do PMeV indicou uma similaridade com micovírus relacionados com a família *Totiviridae* (Araújo *et al.*, 2007; Daltro *et al.*, 2014; Abreu *et al.*, 2015). A banda de 4,5 kb foi inicialmente considerado como um RNA viral subgenômico. No entanto, após recentes relatos de um vírus relacionado ao gênero *Umbravirus* associado à meleira do mamoeiro no México, decidiu-se sequenciar e caracterizar as duas moléculas de RNA associadas à doença.

A sequência parcial obtida a partir do dsRNA (PMeV-ES), indica que ele possui duas ORFs preditas em um arranjo característico de membros da família *Totiviridae*. Esta família inclui vírus que possuem apenas uma molécula de dsRNA como genoma e codificam uma proteína capsidial responsável pela formação do vírion e encapsidação do genoma viral (Fauquet e Fargette, 2005).

A maioria dos vírus de plantas conhecidos têm um genoma de RNA e durante seu ciclo de replicação geram moléculas de dsRNA a partir do ssRNA genômico. Neste sentido, estudos de biodiversidade de vírus têm utilizado a extração e o sequenciamento do dsRNA extraído de plantas com o intuito de identificar novas espécies virais. Surpreendentemente, em diversos estudos foram identificados possíveis membros da família *Totiviridae* infectando plantas (Roossinck *et al.*, 2010). O sequenciamento de uma molécula de dsRNA isolada de *Panax notoginseng* resultou na identificação de um novo vírus de dsRNA com uma sequência e organização genômica semelhante a de um totivírus. O panax notoginseng virus A (PnVA) foi proposto como um membro do gênero *Totivirus*, família *Totiviridae*. Embora todos os membros deste gênero infectem fungos, nenhum sintoma associado à doença fúngica foi observado nas folhas utilizadas para isolar o PnVA. Além disso, a grande quantidade de dsRNA viral obtido torna pouco provável que o

vírus seja derivado de um fungo endofítico (Guo *et al.*, 2015). Em outra abordagem, o sequenciamento de siRNAs de *C. papaya* identificou sequências similares a de vírus da família *Totiviridae* (Kreuze, 2014). Considerando os principais critérios taxonômicos para diferenciação entre as famílias e gêneros: tipo e organização do genoma viral, estratégia da replicação viral e a estrutura do vírion; juntamente com os resultados obtidos neste trabalho e os dados da literatura, é plausível propor que a família *Totiviridae* inclua vírus que infectam plantas como membros.

A sequência obtida a partir do ssRNA de aproximadamente 4,5 kb, corresponde a um vírus relacionado a espécies do gênero *Umbravirus*, nomeado PMeV2-ES. O PMeV2-ES tem alta similaridade com o PMeV-Mx e com o PpVQ, um vírus semelhante a umbravírus descrito recentemente no Equador (Quito-Avila *et al.*, 2015). O PMeV-Mx foi detectado em plantas de mamão com sintomas típicos da meleira no México (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). O PpVQ foi detectado em plantas de mamão também infectadas pelo vírus *Papaya ringspot virus* (PRSV). Curiosamente, os sintomas da meleira não foram relatados no Equador. Os resultados obtidos das comparações de sequências e da análise filogenética entre os vírus PMeV2, PpVQ e PMeV-Mx sugerem que eles podem ser diferentes isolados do mesmo umbravírus ou de um vírus estreitamente relacionado aos umbravírus. É importante destacar que eles são distintos do dsRNA do PMeV.

Os umbravírus são dependentes da presença de um vírus auxiliar, tipicamente, um membro da família *Luteoviridae*, para a formação de partículas virais capazes de encapsidar o RNA do umbravírus (Talianky e Robinson, 2003). Entretanto, os dados obtidos nesse trabalho não indicaram a presença de um luteovírus nos mamoeiros com sintomas de meleira. Assim, supõe-se que o PMeV é o vírus auxiliar do PMeV2. Para identificar a proteína capsidial responsável pela encapsidação do RNA do PMeV2, as proteínas estruturais extraídas das partículas virais purificadas foram analisadas por espectrometria de massa. Todos os peptídeos sequenciados apresentaram 100% de identidade com a sequência de aminoácidos da ORF1 do PMeV, indicando fortemente que o PMeV atua como um vírus auxiliar para o PMeV2 e que a CP do PMeV forma partículas virais híbridas encapsidando o ssRNA do PMeV2. Este é o primeiro exemplo de uma proteína capsidial sendo capaz de encapsidar ambas as formas dsRNA e ssRNA, e também o primeiro relato de um umbravírus associado a um vírus não pertencente ao gênero *Luteovirus*.

Curiosamente, em todas as plantas analisadas, sintomáticas ou assintomáticas para a meleira, o PMeV foi detectado, sugerindo que este vírus não pode sozinho desencadear os sintomas da meleira. Os vírus persistentes de plantas causam pouco ou nenhum efeito evidente e estão presentes em baixa carga viral no hospedeiro, não se movimentam célula-a-célula, não são transmitidos horizontalmente, mas são transmitidos por quase 100% das sementes. Eles são encontrados em diversas culturas, incluindo o feijão, o pimentão e o arroz, na quais já foram mais extensivamente estudadas (Roossinck, 2013).

A origem dos vírus persistentes de plantas é desconhecida, mas a sua semelhança com micovírus sugere a transmissão através dos reinos *Plantae* e *Fungi*. As plantas são quase sempre colonizadas por numerosos fungos endofíticos e, durante essa interação, existe uma oportunidade para a troca de vírus entre as células da planta e do fungo. Até agora, os vírus persistentes de plantas e fungos têm sido reconhecidos como membros das famílias *Partitiviridae* e *Endornaviridae* (King *et al.*, 2011), e análises filogenéticas dessas famílias suportam a transmissão de vírus entre esses dois hospedeiros (Roossinck, 2013). A descoberta de um vírus persistente em mirtilo, mas não relacionado a nenhuma destas famílias e, curiosamente com uma organização genômica característica da família *Totiviridae* indica que outras famílias podem incluir vírus persistentes como membros (Martin *et al.*, 2011).

A maioria dos vírus persistentes de plantas têm genoma de dsRNA e codificam apenas uma RdRp e uma CP, sem a proteína de movimento essencial para a infecção sistêmica. Portanto, não há movimento célula a célula ou transporte do vírus dentro da planta, exceto quando ocorre a divisão celular (Boccardo *et al.*, 1987). Apesar do PMeV não codificar uma proteína de movimento, o vírus pode infectar o mamoeiro sistemicamente. Sabendo que o PMeV está localizado especialmente nos laticíferos da planta (Kitajima *et al.*, 1993), o aumento da fluidez e a exsudação de látex durante a infecção sugerem que o vírus utilize os vasos laticíferos para se mover sistemicamente na planta. No entanto, uma situação diferente pode ocorrer durante a infecção mista: o PMeV poderia utilizar a proteína de movimento do PMeV2 para se movimentar. A proteína codificada pela ORF3 dos umbravírus desempenha um papel fundamental no movimento a longa distância do vírus (Talianky e Robinson, 2003). Embora o PMeV2 não codifique uma proteína

similar à proteína da ORF3 de umbravírus, é possível que a proteína codificada pela ORF1 seja responsável pelo movimento do vírus na planta.

A presença dos sintomas durante uma infecção viral pode estar relacionada a uma maior adaptação do vírus ao hospedeiro. Essa maior adaptação pode ser consequência de interação mais eficiente entre fatores virais e do hospedeiro, levando a uma taxa maior de replicação na célula, movimentos célula-a-célula e a longa distância mais rápidos e eficientes, capacidade de invadir diferentes tecidos além do floema (Tyler e Fields, 1996). Assim, os sintomas induzidos apenas na presença do PMeV2 e a maior concentração viral em comparação com o PMeV indicam uma adaptação diferencial de cada um dos vírus ao mamoeiro. Curiosamente, no México onde a doença é mais severa que no Brasil é notável através da eletroforese do RNA total extraído de plantas sintomáticas a maior intensidade da banda de 4,5kb que correspondente ao genoma do PMeV2.

Dessa forma, neste trabalho, mostramos a interação entre dois vírus de RNA, PMeV e PMeV2, em plantas com sintomas típicos da meleira do mamoeiro. O PMeV possui genoma de dsRNA e está relacionado aos totivírus, enquanto o PMeV2 possui genoma de ssRNA, não codifica uma proteína capsidial e está relacionado aos vírus do gênero *Umbravirus*. Durante esta interação, o PMeV2 utiliza a CP do PMeV para a encapsidação do ssRNA.

7. CONCLUSÕES

- A meleira do mamoeiro está associada à infecção mista pelo PMeV e PMeV2;
- O PMeV é o primeiro vírus de plantas relacionado à espécie da família *Totiviridae*;
- O PMeV2 é um vírus relacionado a espécies do gênero *Umbravirus*. Este é o primeiro relato de um umbravírus associado a um vírus não pertencente ao gênero *Luteovirus*.
- O PMeV age como um vírus persistente em infecções simples. O PMeV2 não é encontrado infectando o mamoeiro isoladamente;
- A CP do PMeV é responsável pela encapsidação do ssRNA do PMeV2. Este é o primeiro exemplo de uma proteína capsidial sendo capaz de encapsidar dsRNA e ssRNA.
- Nas plantas sintomáticas ocorre a maior concentração viral do PMeV2 em comparação com as plantas assintomáticas. Não existe diferença de acúmulo do PMeV na plantas sintomáticas e assintomáticas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. F. et al. Sequence and genome organization of papaya meleira virus infecting papaya in Brazil. **Archives of Virology**, n. 160, p. 3143–3147, Sep 14 2015.

ABREU, P. et al. A current overview of the Papaya meleira virus, an unusual plant virus. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1853-1870, 2015.

ABREU, P. et al. Molecular diagnosis of *Papaya meleira virus* (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 180, n. 1, p. 11-17, 2012.

ADAMS, I. et al. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of Maize chlorotic mottle virus and Sugarcane mosaic virus causing maize lethal necrosis in Kenya. **Plant Pathology**, v. 62, n. 4, p. 741-749, 2013.

AKIBA, F. Bactérias pleomórficas, Gram negativas, e de crescimento lento em meio de cultura, isoladas do sistema vascular de diversas espécies de plantas apresentando sintomas de declínio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 110-111, 1989.

ALAM, S. L.; ATKINS, J. F.; GESTELAND, R. F. Programmed ribosomal frameshifting: Much ado about knotting! **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 25, p. 14177-14179, 1999.

ARAÚJO, M. M. M. D. et al. Molecular detection of *Papaya meleira virus* in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal of virological methods**, v. 146, n. 1, p. 305-310, 2007.

BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 106-136, 2014.

BLOM, N. et al. Cleavage site analysis in picornaviral polyproteins: discovering cellular targets by neural networks. **Protein Science**, v. 5, n. 11, p. 2203-2216, 1996.

BOCCARDO, G. et al. Cryptic plant viruses. **Advances in Virus Research**, v. 32, p. 171-214, 1987.

BRIERLEY, I.; PENNELL, S.; GILBERT, R. J. Viral RNA pseudoknots: versatile motifs in gene expression and replication. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 598-610, 2007.

CAI, G. et al. A new virus from the plant pathogenic oomycete *Phytophthora infestans* with an 8 kb dsRNA genome: the sixth member of a proposed new virus genus. **Virology**, v. 435, n. 2, p. 341-349, 2013.

CHEN, S. et al. The complete genome sequence of a novel maize-associated totivirus. **Archives of virology**, p. 1-4, 2015.

DALTRO, C. B. et al. Genetic diversity studies of Papaya meleira virus. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 104-108, 2014.

DATTA, S. et al. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses. **World journal of virology**, v. 4, n. 3, p. 265, 2015.

DEMLER, S. A. et al. Assessment of the autonomy of replicative and structural functions encoded by the luteo-phase of pea enation mosaic virus. **Journal of general virology**, v. 75, n. 5, p. 997-1007, 1994.

DINMAN, J. D.; ICHO, T.; WICKNER, R. B. A-1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 1, p. 174-178, 1991.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

FAOSTAT. **Crop Production** 2014.

FAUQUET, C.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. **Virol J**, v. 2, p. 64, 2005.

GUO, L. et al. Identification and molecular characterization of Panax notoginseng virus A, which may represent an undescribed novel species of the genus Totivirus, family Totiviridae. **Archives of virology**, p. 1-4, 2015.

HAUGLAND, Ø. et al. Cardiomyopathy syndrome of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family. **Journal of virology**, v. 85, n. 11, p. 5275-5286, 2011.

HUANG, S.; GHABRIAL, S. A. Organization and expression of the double-stranded RNA genome of Helminthosporium victoriae 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 22, p. 12541-12546, 1996.

KANG, J.-G. et al. The H1 double-stranded RNA genome of Ustilago maydis virus-H1 encodes a polyprotein that contains structural motifs for capsid polypeptide, papain-like protease, and RNA-dependent RNA polymerase. **Virus research**, v. 76, n. 2, p. 183-189, 2001.

KELLER, A. et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical chemistry**, v. 74, n. 20, p. 5383-5392, 2002.

KING, A. M.; ADAMS, M. J.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Elsevier, 2011. ISBN 0123846846.

KITAJIMA, E. W. et al. Association of isometric viruslike particles, restricted to laticifers, with "meleira" ("Sticky disease") of papaya (*Carica papaya*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p. 118-122, 1993.

KOZLAKIDIS, Z. et al. Molecular characterisation of two novel double-stranded RNA elements from *Phlebiopsis gigantea*. **Virus genes**, v. 39, n. 1, p. 132-136, 2009.

KREUZE, J. siRNA deep sequencing and assembly: piecing together viral infections. In: (Ed.). **Detection and Diagnostics of Plant Pathogens**: Springer, 2014. p.21-38. ISBN 9401790191.

KREUZE, J. F. et al. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. **Virology**, v. 388, n. 1, p. 1-7, 2009.

LI, H. et al. RNA sequence determinants of a coupled termination-reinitiation strategy for downstream open reading frame translation in *Helminthosporium victoriae* virus 190S and other victoriviruses (Family Totiviridae). **Journal of virology**, v. 85, n. 14, p. 7343-7352, 2011.

LIU, H. et al. Discovery of novel dsRNA viral sequences by in silico cloning and implications for viral diversity, host range and evolution. **PloS one**, v. 7, n. 7, 2012.

LIVSHITS, M.; AMOSOVA, O.; LYUBCHENKO, Y. L. Flexibility difference between double-stranded RNA and DNA as revealed by gel electrophoresis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 7, n. 6, p. 1237-1249, 1990.

MACIEL-ZAMBOLIM, E. et al. Purification and some properties of Papaya meleira virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 389-394, 2003.

MARSTON, D. A. et al. Next generation sequencing of viral RNA genomes. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

MARTIN, R. R.; ZHOU, J.; TZANETAKIS, I. E. Blueberry latent virus: an amalgam of the Partitiviridae and Totiviridae. **Virus research**, v. 155, n. 1, p. 175-180, 2011.

NAKAGAWA, J.; TAKAYAMA, Y.; SUZUKAMA, Y. Exudação de látex pelo mamoeiro. Estudo de ocorrência em Teixeira de Freitas, BA. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, v. 9, p. 555-559, 1987.

NESVIZHSKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-4658, 2003.

NYLANDER, J. MrModeltest v2. Program distributed by the author. **Evolutionary Biology Centre, Uppsala University**, v. 2, 2004.

PEREZ-BRITO, D. et al. First report of *Papaya meleira virus* (PMeV) in Mexico. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 71, p. 13564-13570, 2012.

POULOS, B. T. et al. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 4, p. 987-996, 2006.

QUITO-AVILA, D. et al. Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-6, 2015.

RADFORD, A. D. et al. Application of next-generation sequencing technologies in virology. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 9, p. 1853-1868, 2012.

RODRIGUES, C. H.; VENTURA, J. A.; MAFFIA, L. A. Distribuição e transmissão da meleira em pomares de mamão no Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira** v. 14, p. 118, 1989.

RODRIGUES, S. P. et al. Effects of the Papaya meleira virus on papaya latex structure and composition. **Plant cell reports**, v. 28, n. 5, p. 861-871, 2009.

RODRIGUES, S. P. et al. Simplified molecular method for the diagnosis of Papaya meleira virus in papaya latex and tissues. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 281-283, 2005.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROOSSINCK, M. J. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. **Annual review of genetics**, v. 46, p. 359-369, 2012.

ROOSSINCK, M. J. Plant virus ecology. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 5, 2013.

ROOSSINCK, M. J. et al. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. **Molecular Ecology**, v. 19, n. s1, p. 81-88, 2010.

RYABOV, E. et al. Genus Umbravirus. **Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. **Virus Taxonomy**, p. 1191-1195, 2012.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SPEIR, J. A.; JOHNSON, J. E. Virus particle structure: non-enveloped viruses. In: MAHY BWJ, V. R. M. (Ed.). **Encyclopedia of Virology**. 3. Oxford, UK: Elsevier Academic Press, 2008. p.380-393.

SPERSCHNEIDER, J.; DATTA, A. DotKnot: pseudoknot prediction using the probability dot plot under a refined energy model. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 7, p. e103-e103, 2010.

SYLLER, J. Molecular and biological features of umbraviruses, the unusual plant viruses lacking genetic information for a capsid protein. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 63, n. 1, p. 35-46, 2003.

TALIANSKY, M. et al. An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. **Journal of virology**, v. 77, n. 5, p. 3031-3040, 2003.

TALIANSKY, M. E.; ROBINSON, D. J. Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 8, p. 1951-1960, 2003.

TYLER, K. L.; FIELDS, B. N. Pathogenesis of viral infections. **Fields virology**, v. 3, p. 173-218, 1996

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; DA SILVA TATAGIBA, J. Papaya diseases and integrated control. In: (Ed.). **Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II**: Springer, 2004. p.201-268. ISBN 1402018231.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S. A. H. M. (Ed.). **Diseases of Fruits and Vegetables: Springer**, v.II, 2004. p.201-268. ISBN 1402018231.

VERBEEK, M. et al. Lettuce necrotic leaf curl virus, a new plant virus infecting lettuce and a proposed member of the genus Torradovirus. **Archives of virology**, v. 159, n. 4, p. 801-805, 2014.

WU, Q. et al. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. **Annual review of phytopathology**, v. 53, p. 425-444, 2015.

WU, Q. et al. Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing and a new computational algorithm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 10, p. 3938-3943, 2012.

YU, L. et al. Novel Hypovirulence-Associated RNA Mycovirus in the Plant-Pathogenic Fungus *Botrytis cinerea*: Molecular and Biological Characterization. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 7, p. 2299-2310, 2015.

ZAMUDIO-MORENO, E. et al. Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1145-1154, 2015.

9. ANEXOS

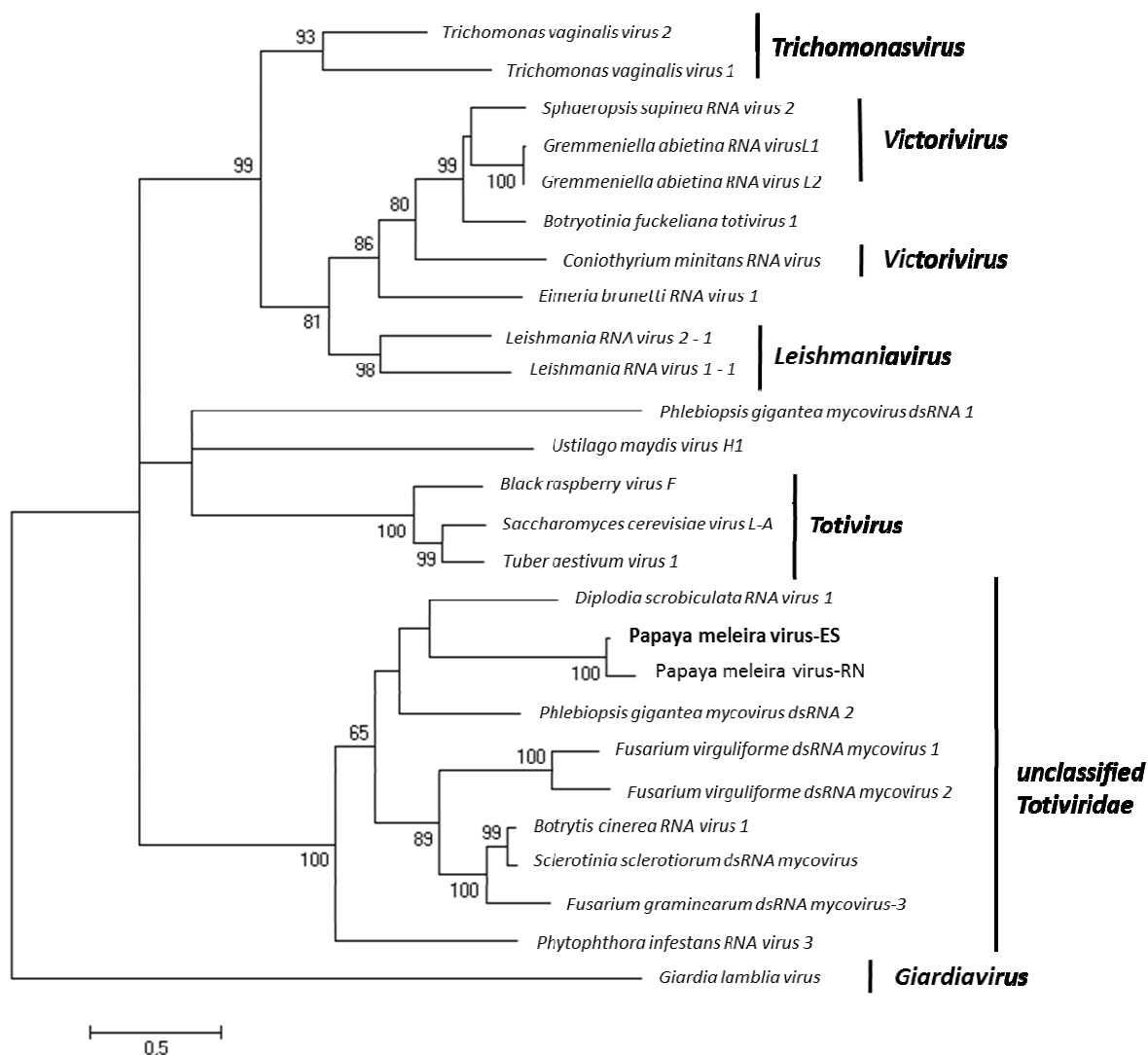
Anexo 1. Número da amostra, local da coleta, presença do PMeV, presença do PMeV2 e presença ou ausência de sintomas nos mamoeiros.

Nº da amostra	Local da coleta	PMeV	PMeV2	Sintomática/ Assintomática
1	Sooretama	+	+	Sintomática
2		+	+	Sintomática
3		+	+	Sintomática
4		+	+	Sintomática
5		+	+	Sintomática
6		+	+	Sintomática
7		+	+	Sintomática
8		+	+	Sintomática
9		+	+	Sintomática
10		+	+	Sintomática
11		+	+	Sintomática
12		+	+	Sintomática
13		+	+	Sintomática
14		+	+	Sintomática
15		+	+	Sintomática
16		+	+	Sintomática
17		+	+	Sintomática
18		+	+	Sintomática
19		+	+	Sintomática
20		+	+	Sintomática

21		+	+	Sintomática
22		+	+	Sintomática
23		+	+	Sintomática
24		+	+	Sintomática
25		+	+	Sintomática
26		+	+	Sintomática
27		+	+	Sintomática
28		+	+	Sintomática
29		+	+	Sintomática
30		+	+	Sintomática
31		+	+	Sintomática
32		+	+	Sintomática
33		+	+	Sintomática
34		+	+	Sintomática
35		+	+	Sintomática
36		+	+	Sintomática
37		+	+	Sintomática
38		+	+	Sintomática
39		+	+	Sintomática
40		+	+	Sintomática
41		+	+	Sintomática
42		+	+	Sintomática
43		+	+	Sintomática
44		+	+	Sintomática
45		+	+	Sintomática
46		+	+	Assintomática
47		+	+	Assintomática
48		+	+	Assintomática
49		+	+	Assintomática
50		+	+	Assintomática
51		+	+	Assintomática
52		+	+	Assintomática
53		+	-	Assintomática
54		+	-	Assintomática
55		+	-	Assintomática
56		+	-	Assintomática
57	Baixo Guandu	+	+	Sintomática
58	Vitória	+	-	Assintomática
59		+	+	Assintomática
60		+	+	Assintomática
61		+	-	Assintomática
62		+	-	Assintomática
63	luna	+	-	Assintomática
64	Pinheiros	+	+	Sintomática
65		+	+	Sintomática

66		+	+	Sintomática
67		+	+	Sintomática
68		+	+	Sintomática
69		+	+	Sintomática
70		+	-	Assintomática
71		+	-	Assintomática
72		+	-	Assintomática
73		+	-	Assintomática
74		+	-	Assintomática
75		+	-	Assintomática
76		+	-	Assintomática
77		+	-	Assintomática
78		+	-	Assintomática
79		+	-	Assintomática
80		+	-	Assintomática
81		+	-	Assintomática
82		+	-	Assintomática
83		+	-	Assintomática
84		+	-	Assintomática
85		+	-	Assintomática
86		+	-	Assintomática
87		+	-	Assintomática
88		+	-	Assintomática
89		+	-	Assintomática
90		+	-	Assintomática
91		+	-	Assintomática
92		+	-	Assintomática
93	São Paulo	+	-	Assintomática
94		+	-	Assintomática
95		+	-	Assintomática
96		+	-	Assintomática
97		+	-	Assintomática
98	Bahia	+	+	Sintomática
99	Ceará	+	+	Sintomática

Anexo 2. Relação filogenética entre o PMeV e vírus relacionados. Árvore filogenética baseada no alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína RdRp do papaya umbravirus (PMeV) e de membros da família *Totiviridae*. A árvore foi obtida pelo método de máxima verossimilhança (modelo de substituição: WAG + G + I) e com um bootstrap de 1.000 repetições para determinar a confiabilidade de cada ramo gerado na análise. Os valores de bootstrap estão indicados em cada nó da árvore. Os nomes do vírus utilizados na análise e seus respectivos n° de acesso no Genbank estão listados na Tabela 2.



Anexo 3. Relação filogenética entre o PMeV2 e vírus relacionados. Árvore filogenética baseada no alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína RdRp do papaya umbravirus (PMeV2) e de membros da família *Tombusviridae*. A árvore foi obtida pelo método de máxima verossimilhança (modelo de substituição: WAG + G + I) e com um bootstrap de 1.000 repetições para determinar a confiabilidade de cada ramo gerado na análise. Os valores de bootstrap estão indicados em cada nó da árvore. Os nomes do vírus utilizados na análise e seus respectivos n° de acesso no Genbank estão listados na Tabela 2.

